

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Agraria

Dottorato di ricerca in Biologia Vegetale e Produttività della Pianta Coltivata

**STUDIO DELL'INFLUENZA GENOTIPO – AMBIENTE
SULLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE
DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA (*Olea europea* L.)**

Docente guida: Prof. Daniele BASSI

Docente di supporto: Prof. Graziano ZOCCHI

Ricercatore di supporto: Dott. Osvaldo FAILLA

Dottoranda:

Dott.^{SSA} Debora TURA

matricola n° R03717

Dottorato del XV ciclo

Anno Accademico 2002 - 2003

SOMMARIO

Pagina

1 – INTRODUZIONE E SCOPO

1.1 – Olivo e lipogenesi	1
1.1.1 – Morfologia e fisiologia del frutto	1
1.1.2 – Biosintesi lipidica nelle olive	3
1.1.3 – Biogenesi dell'aroma nell'olio vergine di oliva	5
1.2 – Olio vergine di oliva	9
1.2.1 – Caratteristiche fisiche	9
1.2.2 – Composizione chimica	9
1.2.2.1 – Frazione saponificabile	9
1.2.2.2 – Frazione insaponificabile	10
1.2.3 – Valore nutritivo e salutistico dell'olio vergine di oliva	16
1.2.3.1 – Benefici nutrizionali	16
1.2.3.2 – Stabilità all'autossidazione	17
1.2.4 – Economia e marketing dell'olio di oliva	17
1.2.4.1 – Mercato mondiale	17
1.2.4.2 – Mercato italiano	17
1.3 – Parametri ed indici di qualità	18
1.3.1 – Fattori che influenzano la qualità	19
1.3.1.1 – Fattori agronomici che agiscono indirettamente sulla "qualità d'ingresso"	20
1.3.1.2 – Fattori tecnologici che agiscono direttamente sulla "qualità di processo"	22
1.3.2 – Salvaguardia e tutela della qualità	24
1.3.2.1 – Frodi	24
1.3.2.2 – Difetti	25
1.3.2.3 – Alterazioni	25
1.3.3 – Controlli analitici bromatologici per la valutazione della qualità	27
1.3.3.1 – Metodiche analitiche obbligatorie	27
1.3.3.2 – Metodiche analitiche complementari	31
1.3.3.3 – Tecniche innovative	35
1.3.3.4 – Metodi statistici	38

2 – OBIETTIVI DELLA RICERCA

2.1 – Premessa	41
2.2 – Genotipo e qualità	42
2.2.1 – Caratterizzazione chemiometrica	42
2.2.2 – Caratterizzazione enzimatica	42
2.2.3 – Caratterizzazione aromatica	42
2.3 – Ambiente e qualità	43
2.3.1 – Influenze nell'area gardesana	43
2.3.2 – Influenze regionali in Italia	43

3 – METODOLOGIE**3.1 – Campionamenti**

3.1.1 – Genotipo e qualità: caratterizzazione chemiometrica	45
3.1.2 – Genotipo e qualità: caratterizzazione enzimatica	45
3.1.3 – Genotipo e qualità: caratterizzazione aromatica	46
3.1.4 – Ambiente e qualità: influenze nell'area gardesana	47
3.1.5 – Ambiente e qualità: influenze regionali in Italia	47

3.2 – Determinazioni sulle olive

3.2.1 – Indice di maturazione	49
3.2.2 – Contenuto in acqua e grado d'inolizione	51
3.2.3 – Lavorazione delle olive	53

3.3 – Enzimologia della lipossigenasi ed idroperossido liasi

3.3.1 – Estrazione degli enzimi dalle olive	56
3.3.2 – Dosaggio enzimatico	57
3.3.3 – Preparazione dei substrati	57
3.3.4 – Attività enzimatica	58

3.4 – Determinazioni analitiche sugli oli monovarietali

3.4.1 – Determinazione dell'acidità	59
3.4.2 – Determinazione del numero di perossidi	59
3.4.3 – Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto	60
3.4.4 – Determinazione degli acidi grassi	61
3.4.5 – Determinazione dei trigliceridi	62
3.4.6 – Determinazione degli alcoli alifatici, triterpenici, e degli steroli	63
3.4.7 – Determinazione dei polifenoli	65
3.4.8 – Determinazione dei tocoferoli	66
3.4.9 – Determinazione del colore e dei pigmenti: carotenoidi e clorofille	66
3.4.10 – Determinazione della stabilità ossidativa	67
3.4.11 – Determinazione dei composti volatili nello spazio di testa	69
3.4.12 – Analisi sensoriale	70

3.5 – Determinazione del profilo aromatico negli oli commerciali

3.5.1 – Micro-estrazione in fase solida (SPME)	71
3.5.2 – Gas-cromatografia con rivelatore ad ionizzazione di fiamma (GC-FID)	71
3.5.3 – Gas-cromatografia con spettrometro di massa (GC-MS)	72

3.6 – Analisi statistiche

3.6.1 – Analisi della varianza (ANOVA)	75
3.6.2 – Analisi di raggruppamento (cluster analysis)	76
3.6.3 – Analisi discriminante	77
3.6.4 – Analisi di regressione multipla	77
3.6.5 – Elaborazione statistica dell'analisi sensoriale	77

4 – RISULTATI

4.1 – Genotipo e qualità: caratterizzazione chemiometrica	79
4.1.1 – Acidi grassi	83
4.1.2 – Trigliceridi	85
4.1.3 – Alcoli alifatici	87
4.1.4 – Alcoli triterpenici	89
4.1.5 – Steroli	91
4.1.6 – Polifenoli	93
4.1.7 – Tocoferoli	95
4.1.8 – Carotenoidi, clorofille e fitolo	97
4.1.9 – Composti volatili	99
4.1.10 – Similarità chemiometrica dei gruppi	101
4.1.11 – Stabilità ossidativa	105
4.1.12 – Analisi sensoriale	106
4.2 – Genotipo e qualità: caratterizzazione enzimatica	109
4.2.1 – Lipossigenasi	109
4.2.2 – Idroperossido liasi	109
4.2.3 – Considerazioni	111
4.3 – Genotipo e qualità: caratterizzazione aromatica	112
4.3.1 – Influenza della cultivar	112
4.3.2 – Influenza della maturazione	113
4.3.3 – Influenza della gramolazione	113
4.4 – Ambiente e qualità: influenze nell'area gardesana	116
4.4.1 – Acidi grassi	119
4.4.2 – Trigliceridi	121
4.4.3 – Alcoli alifatici	123
4.4.4 – Alcoli triterpenici	125
4.4.5 – Steroli	127
4.4.6 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti e stabilità ossidativa	129
4.4.7 – Composti volatili	131
4.4.8 – Variabili chemiometriche caratterizzanti	133
4.4.9 – Stabilità ossidativa	136
4.4.10 – Analisi sensoriale	137
4.5 – Ambiente e qualità: influenze regionali in Italia	139
4.5.1 – Acidi grassi	141
4.5.2 – Trigliceridi	144
4.5.3 – Alcoli alifatici	148
4.5.4 – Alcoli triterpenici	151
4.5.5 – Steroli	154
4.5.6 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti e stabilità ossidativa	158

	Pagina
4.5.7 – Composti volatili	161
4.5.8 – Variabili chemiometriche caratterizzanti	165
4.5.9 – Stabilità ossidativa	167
4.5.10 – Analisi sensoriale	169
5 – CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	
5.1 – Genotipo e qualità	173
5.1.1 – Caratterizzazione chemiometrica	173
5.1.2 – Caratterizzazione enzimatica	174
5.1.3 – Caratterizzazione aromatica	174
5.2 – Ambiente e qualità	175
5.2.1 – Influenze nell'area gardesana	175
5.2.2 – Influenze regionali in Italia	176
6 – BIBLIOGRAFIA	177
7 – RIASSUNTO	191

1 – INTRODUZIONE

1.1 – OLIVO E LIPOGENESI

L'olivo è una pianta arborea sempreverde dicotiledone, appartenente alla famiglia delle Oleaceae, genere *Olea*, specie *Olea europea* L. E' una pianta molto longeva e mostra la tendenza all'alternanza della produzione. I fiori sono ermafroditi, riuniti in infiorescenze dette mignole, e non sempre sono capaci di autofecondarsi (Antolini, 1997; Cimato *et al.*, 1997 e 1999; Harwood and Aparicio, 2000; Maffei, 1999).

1.1.1 – Morfologia e fisiologia del frutto

Il frutto dell'olivo (figura 1) è una drupa di forma allungata (ellissoidale, ovoidale o sferoidale) e di peso variabile (2-12g); è costituita da un'epidermide (epicarpo), una parte carnosa ed oleosa (mesocarpo) ed un nocciolo (endocarpo) contenente il seme.

Figura 1 – Struttura morfologica e fasi fisiologiche dell'oliva.



- L'epicarpo (buccia) è una pellicola di modesto spessore che protegge il frutto. Rappresenta circa l'1,3% del frutto ed è costituita da uno strato di cellule cementate da cutina e ricoperte dalla pruina (sostanza cerosa). Inizialmente è di colore verde, ma con la maturazione diviene rossastra fino a diventare nera.
- Il mesocarpo (polpa) è un tessuto di spessore variabile e rappresenta il 70-80% del frutto. Le cellule sono ricche di protoplasma e sono cementate da pectine.
- L'endocarpo (nocciolo) è l'involucro legnoso che racchiude il seme.
- Il seme non supera il 3% in peso del frutto ed è costituito dal tegumento con funzione protettiva, dall'endosperma con funzione di accumulo delle sostanze energetiche, e dall'embrione.

La polpa contiene in media 50-60% di acqua, 15-25% di olio e 20-30% di altri costituenti (carboidrati, pectine, acidi organici, proteine, polifenoli, pigmenti, cere, vitamine, sali minerali, ecc.).

Le fasi fisiologiche dell'oliva possono essere schematizzate in 3 fasi:

- Accrescimento del frutto. L'inizio dello sviluppo della drupa è caratterizzato da un'intensa moltiplicazione cellulare (citochinesi), il cui scopo è di aumentare il numero di cellule del tessuto ovarico; segue una crescita più moderata nella quale il nocciolo si lignifica dopo la formazione del seme; nell'ultima fase di crescita le cellule della drupa aumentano di volume per distensione creando le condizioni ottimali per l'accumulo di olio.

- **Biosintesi ed accumulo di olio.** Le molecole lipidiche vengono prodotte dalla pianta ed accumulate nei semi (circa 1-2%) e nella polpa (la maggior parte). L'olio, racchiuso in sacche membranose, organuli citoplasmatici detti "corpi lipidici" che ne impediscono il contatto con il protoplasma (dove sono presenti gli enzimi), si presenta all'inizio sottoforma di minuscole gocce che via via aumentano il loro volume fino ad occupare gran parte della cellula. A maturazione del frutto l'olio occuperà circa l'80% dello spazio intracellulare, di questo il 70-85% è sottoforma di corpi lipidici, e sarà olio disponibile o libero, mentre il rimanente è disperso in minute goccioline nel citoplasma, e risulterà olio non disponibile o legato. Molte delle reazioni di biosintesi, che producono sia i componenti principali sia quelli minori, sono spesso incomplete o hanno deviazioni collaterali che appunto determinano la presenza di un numero notevole di componenti secondari; la variabilità di composizione è anche in funzione delle condizioni pedo-climatiche e delle varietà.
- **Maturazione.** La maturazione fisiologica rappresenta la fase conclusiva del ciclo di fruttificazione, cioè il raggiungimento della maturità riproduttiva della pianta, da non confondere con la maturità commerciale connessa all'uso a cui si intende avviare il frutto e quindi importante ai fini economici. Nel corso della maturazione il frutto subisce modificazioni a carico della consistenza della polpa, dell'attività fotosintetica e respiratoria, della variazione dell'epicarpo e del mesocarpo, del contenuto in zuccheri, sostanza secca, olio, polifenoli (Bianco and Uccella, 2000; Hartzallah e Kiritsakis, 1999; McDonald *et al.*, 2001), tocoferoli, steroli (Ajana *et al.*, 1998), alcoli, pigmenti (Gandul-Rojas *et al.*, 1996a e 1999; Minguéz-Mosquera *et al.*, 1989 e 1995), ecc. Sono variazioni legate a complessi processi metabolici che incidono sulla crescita, sui componenti principali e secondari del frutto, e sulla sua morfologia (Ranalli *et al.*, 1998). Facendo riferimento al cambio di colore della drupa, il ciclo di maturazione può essere diviso in 4 periodi. Lo **stadio erbaceo** è caratterizzato dalla colorazione verde della buccia, la polpa è dura, il seme inizia a crescere e nel complesso si ha un aumento di peso. In questa fase è presente la clorofilla, gli zuccheri solubili raggiungono la massima concentrazione, i polifenoli, i tocoferoli e lo squalene sono presenti in quantità elevata, ed inizia l'accumulo dell'olio sottoforma di trigliceridi. La **fase di invaiatura** è caratterizzata dal cambio di colore del frutto dal verde al rosso-violaceo. La clorofilla si degrada in feofitina e fitina e l'oliva diventa giallognola per la presenza dei caroteni. Sull'epidermide si evidenziano delle macchioline di colore violaceo dovuto agli antociani (polifenoli idrosolubili) che si estendono col tempo a tutto il frutto. I frutti continuano ad accumulare lipidi, ma il peso subisce incrementi limitati a causa della perdita parziale di acqua per traspirazione, anche se la pruina protegge in parte l'epidermide da questo fenomeno. In questa fase viene sintetizzato prevalentemente l'acido oleico e si riscontra una diminuzione del palmitico ed un incremento del linolenico. La **fase di maturazione** è caratterizzata dalla colorazione nera-violacea della buccia con polpa bianca. La drupa raggiunge la massima dimensione e l'olio i livelli più elevati (15-20%), in seguito l'accrescimento diventa stazionario e la biosintesi dei grassi diventa più lenta e poco importante. In questa fase la composizione acidica non sembra variare significativamente, mentre gli acidi organici aumentano, i polifenoli iniziano ad idrolizzare liberando l'oleuropeina ed i fenoli semplici, gli steroli subiscono modeste e differenti variazioni, e gli alcoli aumentano. La **fase di sovraturazione** consiste nella colorazione violacea anche della polpa. Questo periodo rappresenta l'insieme dei processi fisiologici che avvengono nel frutto fino alla cascola dell'oliva. Non avvengono incrementi rilevanti nelle dimensioni dei frutti, l'attività respiratoria diminuisce, aumenta la traspirazione dell'acqua, aumenta l'attività degli enzimi pectolitici (che portano alla degradazione della parete cellulare), e delle lipasi, che degradano i trigliceridi (lipolisi) aumentando così l'acidità e la perdita di antiossidanti.

1.1.2 – Biosintesi lipidica nelle olive

L'accumulo di olio può essere considerato un "incidente" metabolico nella crescita delle cellule del mesocarpo, le quali attivano il processo di formazione degli acidi grassi, predominantemente acido oleico, e successivamente accumulano i gliceridi fino all'abscissione del frutto (Farinelli *et al.*, 2000; Sanchez, 1994).

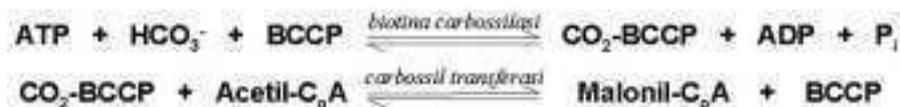
La biosintesi di acidi grassi e di mono-, di- e tri-gliceridi avviene con il metabolismo primario, che avviene in fasi successive: prima vengono prodotti gli acidi grassi e poi questi vengono assemblati al glicerolo. Il precursore di carbonio per la sintesi lipidica è l'anidride carbonica, la quale è fissata durante la fotosintesi nei frutti e nelle foglie. Due sono i meccanismi di carbossilazione: alla luce la CO₂ può essere fissata dal ribosio-1,5-difosfato carbossilasi e fotosinteticamente ridotta nel ciclo di Calvin a dare i triosi fosfato; al buio la CO₂ può essere fissata dalla fosfoenolpiruvato carbossilasi a formare ossalacetato, il quale è ridotto a malato dal NAD-malato deidrogenasi.

Il meccanismo di formazione del precursore più importante per la biosintesi degli acidi grassi, l'acetil-CoA, avviene per rottura degli zuccheri C₆ mediante la glicolisi attraverso due enzimi: nei plastidi, la piruvato deidrogenasi (via preferita per la sintesi degli acidi); nei mitocondri, la piruvato deidrogenasi produce acetil-CoA che viene scisso ad acido acetico, e poi di nuovo attivato ad acetil-CoA una volta entrato nel plastidi.

La biosintesi "De Novo" degli acidi grassi nelle cellule vegetali avviene per l'85% nello stroma dei plastidi dove sono localizzati tre complessi enzimatici: l'acetil-CoA carbossilasi, l'acido grasso sintasi e l'acil-ACP denaturasi (Mancha, 1976).

- L'**acetil-CoA carbossilasi** catalizza la prima reazione nella biosintesi degli acidi grassi carbossilando l'acetil-CoA a malonil-CoA (figura 2). Questo complesso enzimatico contiene tre proteine: la proteina trasportatrice di carbossile mediante biotina (BCCP), che ha la funzione di trasportare la CO₂; la biotina carbossilasi, che catalizza la reazione tra la biotina e la CO₂, e la carbossil transferasi, che sposta la CO₂ sull'acetil-CoA a dare il malonil-CoA. Il meccanismo mediante il quale l'acetil-CoA carbossilasi è attivata sotto l'induzione della luce per la sintesi lipidica è sconosciuto, ma potrebbe essere una conseguenza delle alterazioni nello stroma; anche il meccanismo di regolazione nell'accumulo dei lipidi è un campo ancora oggetto di ricerca.

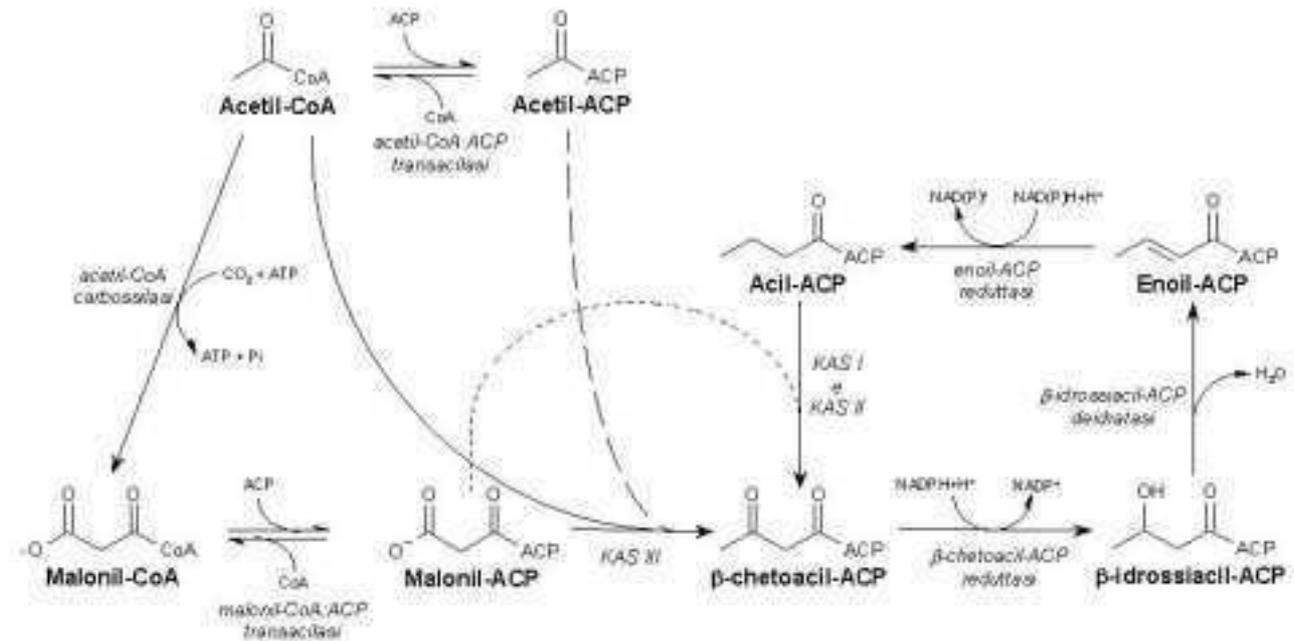
Figura 2 – Meccanismo di azione dell'acetil-CoA carbossilasi.



- L'**acido grasso sintasi** catalizza l'allungamento della catena acilica (figura 3). Questo complesso enzimatico ha 7 siti attivi: il malonil-CoA:ACP transacilasi sostituisce il CoA con l'ACP (proteina trasportatrice di acili) nel malonile, il malonil-ACP è la fonte delle 2 unità di carbonio necessarie per ogni reazione di condensazione; la β-chetoacil-ACP sintasi III (KAS III) catalizza la prima reazione di condensazione tra l'acetil-CoA ed il malonil-ACP a dare il β-chetoacil-ACP: inizialmente si riteneva che questa reazione dovesse avvenire con l'acetil-ACP, ottenuto mediante l'acetil-CoA:ACP transacilasi che sostituisce il CoA con l'ACP nell'acetile, ma attualmente questa funzione non è del tutto chiara ed ovvia; la β-chetoacil-ACP reductasi riduce il β-chetoacil-ACP in β-idrossiacil-ACP; la β-idrossiacil-ACP deidratasi toglie una molecola di acqua al β-idrossiacil-ACP a dare l'enoil-ACP; l'enoil-ACP reductasi riduce l'enoil-

ACP ad acil-ACP; a questo punto riprende il ciclo delle 4 reazioni di condensazione, riduzione, deidratazione e riduzione usate per l'allungamento della catena acilica, la β -chetoacil-ACP sintasi I (KAS I) catalizza le reazioni di condensazione tra gli acil-ACP con il malonil-ACP a dare i β -chetoacil-ACP allungati di 2 carboni fino a C₁₄, questo enzima catalizza la maggior parte delle condensazioni, mentre la β -chetoacil-ACP sintasi II (KAS II) catalizza le reazioni di condensazione tra l'acil C₁₆ (palmitoil)-ACP ed il malonil-ACP a dare l'acil C₁₈ (stearoil)-ACP, questo enzima ha un ruolo determinante della concentrazione degli acidi grassi palmitico e stearico.

Figura 3 – Meccanismo di azione dell'acido grasso sintasi.

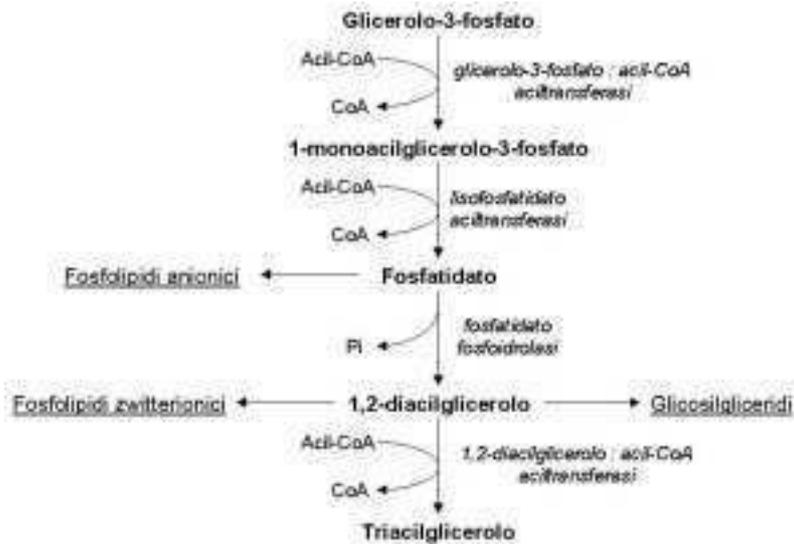


- Le **acil-ACP denaturasi** sono enzimi che modificano l'acido grasso da saturo ad insaturo. Il principale prodotto di accumulo della via "De Novo", localizzata nel plastide per la formazione degli acidi grassi, è l'acido oleico e non lo stearico. La stearoil-ACP Δ 9-desaturasi catalizza una reazione ossidativa e viene introdotto il doppio legame in posizione Δ 9 nella catena dello stearoil-ACP a dare l'oleoil-ACP. Ulteriori desaturazioni producono gli acidi grassi polinsaturi e possono avvenire sia all'interno del plastidi (poco importante) che sul reticolo endoplasmatico. La maggior parte degli acidi grassi prodotti nel plastide sono canalizzati all'esterno nel citosol sottoforma di organelli contenenti un insieme di acil-CoA, ottenuti mediante l'acil-transferasi o tioesterasi (più affine per l'oleoil-ACP) del plastidi che stacca l'ACP dall'acile e lo sostituisce con il CoA. Le desaturazione dell'oleoil-CoA a linoleoil-CoA e poi ancora a linolenoil-CoA avvengono nel citoplasma tramite il Δ 12- e Δ 15-desaturasi presenti sul reticolo endoplasmatico.

Gli acidi grassi vengono assemblati al glicerolo a dare il trigliceride (TAG) attraverso la biosintesi di "Kennedy" (figura 4). Questa via biosintetica consiste in una serie di 4 reazioni: la glicerolo-3-fosfato:acil-CoA aciltransferasi aggiunge il primo acil-CoA al glicerolo-3-fosfato (G-3-P) ottenendo l'1-monoacilglicerolo-3-fosfato (o lisofosfatidato): questo enzima nell'oliva mostra di solito preferenze per il palmitoil-CoA e gli acil-CoA saturi, e secondariamente per il linoleoil-CoA e gli acil-CoA polinsaturi; la lisofosfatidato (o 1-monoacilglicerolo-3-fosfato:acil-CoA) aciltransferasi aggiunge il secondo acil-CoA all'1-monoacilglicerolo-3-fosfato a dare il fosfatidato, il quale è anche un intermedio per la sintesi dei fosfolipidi anionici: questo enzima ha una forte selettività per l'oleoil-CoA; la fosfatidato fosfoidrolasi idrolizza il fosfatidato dando l'1,2-di-

acilglicerolo (DAG), il quale è usato anche per i fosfolipidi zwitterionici e per la formazione dei glicosilgliceridi: la regolazione di questo enzima controlla il tasso di trigliceridi accumulati; ed infine l'1,2-diacilglicerolo:acil-CoA aciltransferasi aggiunge il terzo acil-CoA all'1,2-diacilglicerolo, ottenendo il triacilglicerolo (o trigliceride): questo enzima ha un'ampia specificità e selettività per tutti gli acil-CoA. Dalla seguente biosintesi risulta che gli acidi grassi saturi occupano le posizioni corrispondenti agli ossidrili primari del glicerolo (sn-1,3) mentre gli insaturi, in modo particolare l'oleico, oltre ad occupare le posizioni primarie rimanenti libere, esterificano anche l'ossidrile secondario (sn-2).

Figura 4 – Biosintesi di “Kennedy” per l'assemblaggio dei trigliceridi.



1.1.3 – Biogenesi dell'aroma nell'olio vergine di oliva

L'olio vergine di oliva è preparato dalle olive fresche per mezzo di procedure fisiche (frangitura e spremitura) che viene altamente apprezzato per il suo delicato aroma. L'aroma dell'olio vergine è formato da una complessa miscela di composti volatili, aldeidi, alcoli, chetoni, idrocarburi ed esteri, i quali possono essere analizzati e quantificati attraverso GC-MS. Tra queste sostanze, le aldeidi (esanale, *cis*-3-esenale e *trans*-2-esenale), gli alcoli (esanolo, *cis*-3-esenolo e *trans*-2-esenolo) ed i loro acetil esteri (esil acetato e *cis*-3-esenil acetato), composti a sei atomi di carbonio (C₆), costituiscono il 60-80% dei composti volatili degli oli vergini, ed il 2-*trans*-esenale è il componente principale. Le analisi quantitative dello spazio di testa hanno mostrato che le aldeidi e gli alcoli C₆, insieme agli alcoli C₅, sono i costituenti più importanti dell'aroma dell'olio di oliva, essendo i responsabili delle caratteristiche “note verdi” (foglie, erba appena tagliata, ecc.), e si formano dagli acidi grassi polinsaturi attraverso una cascata di reazioni biochimiche collettivamente conosciute come “via della lipossigenasi” (figura 5). Nel processo di estrazione dell'olio vergine di oliva, la via della lipossigenasi è indotta dalla frangitura dei frutti e procede durante la fase di gramolazione, fino a quando avviene la separazione olio / acqua / sansa. Questa via biochimica (Gardner, 1991; Grechkin, 1998; Hatanaka *et al.*, 1987 e 1993; Ollas *et al.*, 1993; Vick and Zimmerman, 1987a e 1987b) coinvolge una serie di enzimi che ossidano (lipossigenasi) e scindono (idroperossido liasi) gli acidi grassi polinsaturi a dare le aldeidi, le quali sono successivamente ridotte ad alcoli (alcol deidrogenasi), che vengono esterificati con acidi a dare esteri (alcol aciltransferasi). L'aroma di un particolare olio di oliva è il risultato dell'interazione tra i suoi numerosi componenti volatili. Tutti questi composti, per la maggior parte insaturi, possono derivare dagli acidi grassi

polinsaturi, principalmente linoleico e linolenico con regiospecificità per la posizione *n*-6, attraverso la via della lipossigenasi, che è presente nelle cellule della polpa delle olive: questo spiega l'assenza dei composti C₉ nell'olio di oliva.

- L'**acilidrolasi lipolitica** idrolizza gli acidi grassi dal glicerolipide. Gli acidi grassi polinsaturi non sono allo stato libero, ma esterificati al glicerolo a formare le membrane (fosfolipidi e glicolipidi) o come accumulo lipidico (trigliceridi). Gli acidi grassi devono essere rilasciati dalle molecole del glicerolipide attraverso l'azione delle acilidrolasi lipolipidiche, un gruppo di enzimi che includono lipasi (idrolizzano i trigliceridi), fosfolipasi (idrolizzano i fosfolipidi) e galattolipasi (idrolizzano i galattolipidi). L'attivazione degli enzimi è ottenuta dalla distruzione dei tessuti durante l'estrazione dell'olio dalle olive. Nelle olive mature, più del 95% degli acidi grassi sono esterificati a trigliceridi di riserva, i quali contengono il 5-20% degli acidi polinsaturi e principalmente linoleico; mentre più del 2% costituiscono le membrane glicerolipidiche, soprattutto fosfolipidi e galattolipidi, le quali sono ricche di acidi polinsaturi e principalmente linolenico: il linoleico ed il linolenico sono ottimi substrati per la via della lipossigenasi.
- La **lipossigenasi** ossida l'acido grasso polinsaturo a dare l'acido idroperossidico. Catalizza la reazione di ossigenazione degli acidi grassi polinsaturi, come gli acidi linoleico e linolenico, che hanno una sequenza 1-*cis*,4-*cis*-pentadiene (-C=C-C-C=C-), producendo un acido grasso idroperossidico (Georgalaki *et al.*, 1998). La molecola di ossigeno può essere introdotta in un qualsiasi doppio legame della sequenza del pentadiene a formare un gruppo idroperossido, mentre il doppio legame prende una configurazione *trans* e migra al C adiacente per diventare coniugato. Il numero di atomi di carbonio tra la sequenza pentadienica ed il carbossile finale della molecola dell'acido grasso non influenzano molto l'attività enzimatica, ma la distanza tra la sequenza ed il metile terminale deve essere di almeno di 6 atomi di carbonio, perché l'enzima riconosce il dominio idrofobico del substrato. Questo punto è rilevante perché, se l'enzima agisse sugli acidi grassi esterificati, non dovrebbe essere necessaria l'esistenza dell'acilidrolasi per fornire il substrato nella via per la formazione dei composti volatili. La lipossigenasi catalizza anche la scissione anaerobica dell'acido *n*-6-idroperossilinolenico a dare un ossiacido C₁₃ ed un alcool C₅ (2-*cis*-pentenolo o 1-pente-3-olo). Questa reazione inizialmente si pensava fosse catalizzata dall'idroperossido liasi, ma recentemente (Salch *et al.*, 1995) è stata dimostrata dipendere da un isoenzima della lipossigenasi, e questo spiega le apprezzabili quantità di questi alcoli nell'olio. La lipossigenasi può catalizzare anche la formazione di altri composti secondari in condizioni anaerobiche, come chetodieni, dimeri di acidi grassi ed idrocarburi. Le lipossigenasi mostrano preferire gli acidi linoleico e linolenico tra i polinsaturi, ed il gruppo idroperossido può essere introdotto sia in posizione *n*-6 che in posizione *n*-10, formando acidi *n*-6- o *n*-10-*cis,trans*-idroperossidici, ma nelle olive la preferenza è per l'acido linolenico rispetto al linoleico e come regiospecificità alla posizione *n*-6 rispetto all'*n*-10 della molecola.
- L'**idroperossido deidratasi** dall'acido grasso idroperossidico produce ossidi di alleni, dai quali può essere sintetizzato l'acido jasmonico (fitormone coinvolto nella senescenza).
- La **perossigenasi**, partendo sempre dall'acido grasso idroperossidico, dà acidi grassi idrossilati, i quali sono coinvolti nella biosintesi della cutina.
- L'**idroperossido liasi** scinde la molecola dell'acido grasso idroperossidico producendo un aldeide ed un ossiacido (Fauconnier and Marlier, 1997). Catalizza la rottura dell'acido idroperossidico al legame situato tra l'atomo di carbonio caricato del gruppo idroperossido ed il doppio legame *trans* adiacente, quindi libera un aldeide volatile C₆ o C₉ ed un ossiacido C₉ o C₁₂, a seconda della posizione del gruppo idroperossido dell'acido usato. Questo enzima sembra trovarsi legato alla membrana e, nei tessuti verdi fotosintetici, è

trovato nei cloroplasti. Le idroperossido liasi hanno una stretta specificità con il substrato, quindi possono essere classificate in 2 gruppi: le prime, presenti nei tessuti fotosintetici, sono specifiche per gli acidi *n*-6-idroperossidici e sono responsabili per la formazione delle aldeidi C₆ con il caratteristico odore verde; le altre utilizzano gli acidi *n*-10-idroperossidici e catalizzano la formazione di aldeidi C₉. Nella polpa di olive sono stati trovati gli enzimi specifici *n*-6 sia per l'acido idroperossilinoleico che idroperossilinolenico (altamente attivi). L'ossiacido C₁₂ è il precursore per la sintesi dell'acido traumatico (ormone della ferita).

- L'**enal isomerasi** sposta il doppio legame negli enali al carbonio adiacente e ne cambia la configurazione da *cis* a *trans*. Nell'aroma dell'olio di oliva il composto volatile principale è un *2-trans*-enale (*2-trans*-esenale), il quale costituisce più del 50% della quantità dei composti volatili totali determinati con l'analisi dello spazio di testa. Questo enzima catalizza l'isomerizzazione irreversibile dei *3-cis*-enali a *2-trans*-enali nei composti C₆ e C₉. Una reazione d'isomerizzazione chimico-fisica simile, può avvenire nella polpa di olive fornendo calore (ossidazione), questo comporta un accumulo di queste sostanze nell'aroma dell'olio.
- L'**alcol deidrogenasi** riduce le aldeidi ad alcoli. Catalizza la reazione reversibile delle aldeidi alifatiche ai loro corrispondenti alcoli, e sono le responsabili della formazione degli alcoli volatili nell'aroma. Questo enzima è molto diffuso negli esseri viventi ed occupa un ruolo importante nei processi di fermentazione e di degradazione degli zuccheri. L'attività dell'alcol deidrogenasi è NAD o NADP dipendente, utilizza gli idrogeni dei coenzimi ridotti per ridurre il gruppo aldeidico ad alcolico [RO+NAD(P)H+H⁺→ROH+NAD(P)⁺]. L'enzima mostra un'alta affinità per il *2-trans*-esenale, precursore del *2-trans*-esenolo, che è uno dei componenti principali dell'aroma dell'olio di oliva. Il quantitativo massimo di questo enzima nell'oliva è stato trovato quando i frutti sono ancora verdi e la quantità di olio è poco più della metà del contenuto finale, questa osservazione è confermata anche dai dati analitici dello spazio di testa, nei quali il contenuto dagli alcoli C₆ nell'aroma dell'olio di oliva diminuisce all'aumentare della maturazione delle olive.
- L'**alcol aciltransferasi** esterifica l'alcol con un acido carbossilico a dare un estere. Insieme alle aldeidi ed agli alcoli volatili, gli esteri risultano essere costituenti importanti dell'aroma nell'olio, anche se in quantità minore. Questi composti sono formati mediante l'esterificazione, catalizzata dall'alcol aciltransferasi, degli alcoli con gli acidi carbossilici nella forma attivata di acil-CoA. Nelle olive questo enzima sembra essere poco attivo, e questo è confermato anche dalla bassa quantità di esteri volatili trovati nell'aroma dell'olio di oliva mediante l'analisi dello spazio di testa. L'*n*-esanolo ed il *3-cis*-esenolo sono i substrati preferiti da questo enzima, in accordo con la presenza di basse quantità di esil acetato e *3-cis*-esenil acetato presenti nello spazio di testa di campioni di olio vergine di oliva.

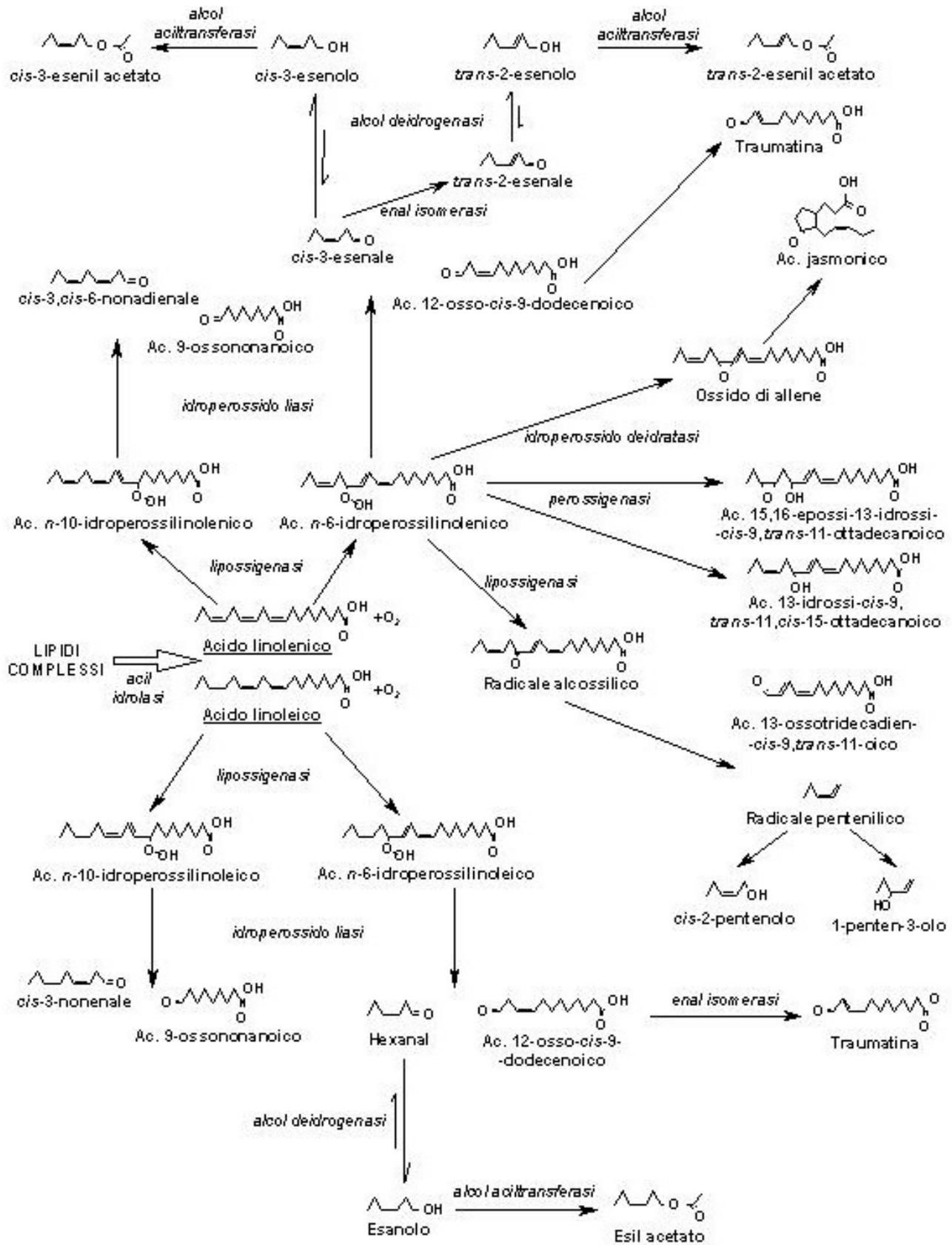
I composti volatili così sintetizzati sono incorporati nell'olio conferendogli il caratteristico aroma. Gli enzimi coinvolti nella produzione di tali composti, possono essere alterati dalle condizioni di estrazione e dallo stadio di maturazione delle olive (Luning *et al.*, 1995).

Un'altra via biochimica intracellulare coinvolta nella biogenesi dell'aroma dell'olio vergine di oliva è data dagli aminoacidi. La struttura di alcuni composti volatili può derivare dal gruppo R (catena laterale) degli aminoacidi valina, leucina ed isoleucina, da cui si ottengono rispettivamente le aldeidi 2-metilpropanale, 3-metilbutanale e 2-metilbutanale. Un'ulteriore attivazione dell'alcol deidrogenasi converte le aldeidi nei corrispondenti alcoli; successivamente, l'azione dell'alcol acil transferasi porta alla formazione degli esteri.

La conoscenza delle proprietà degli enzimi coinvolti in queste vie, di biogenesi dei composti volatili, può aiutare a migliorare le pratiche di estrazione dell'olio variando la temperatura ed il tempo di macerazione.

Le sostanze volatili formate vengono incorporate e conservate nell'olio e possono essere alterate da errate condizioni di estrazione o di conservazione.

Figura 5 – Schema generale della “via della lipossigenasi”.



1.2 – OLIO VERGINE DI OLIVA

Viene definito “olio vergine di oliva” il grasso alimentare derivante dalla frangitura e spremitura delle olive. Questo pregiatissimo prodotto delle olive viene chiamato anche “oro giallo o verde”, per enfatizzarne il suo valore (Antolini, 1997; Capella *et al.*, 1997; Cimato *et al.*, 1997; C.O.I., 1996; Harwood and Aparicio, 2000).

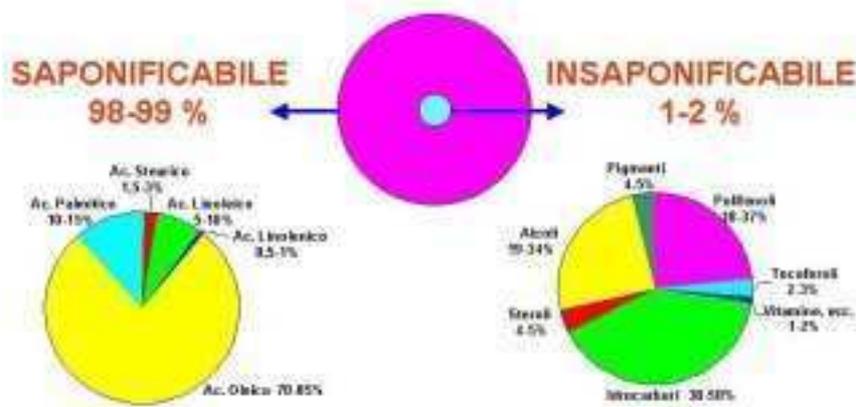
1.2.1 – Caratteristiche fisiche

Dal punto di vista delle caratteristiche fisiche l’olio d’oliva si presenta come un liquido fluido, dal sapore ed odore fruttato e gradevole, di colore giallo paglierino più o meno verdognolo. Negli oli d’oliva, quando la temperatura si abbassa sotto i 15°C, iniziano a formarsi cristalli sempre più abbondanti a mano a mano che la temperatura si abbassa, e quando si raggiungono i 0°C l’olio si presenta come una massa granulosa, untuosa e bianchiccia. La densità degli oli d’oliva misurata a 15°C è di circa 0,916 kg/l.

1.2.2 – Composizione chimica

L’olio di oliva è costituito per il 98-99% da una frazione gliceridica detta “saponificabile” e per il restante 1-2% da una frazione non gliceridica detta “insaponificabile” (figura 6).

Figura 6 – Composizione dell’olio vergine di oliva.

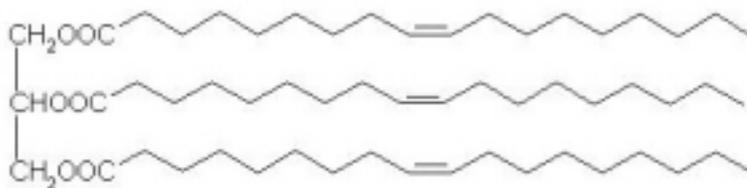


1.2.2.1 – FRAZIONE SAPONIFICABILE

Questa frazione è costituita da mono-, di- e tri –gliceridi (esteri formati da una molecola di glicerolo combinata con una, due o tre molecole di acidi grassi), acidi grassi liberi e componenti minori.

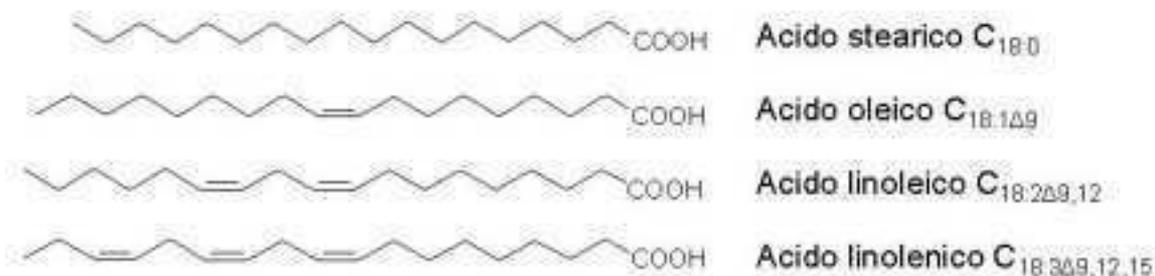
- I **trigliceridi** occupano circa il 95-97% della frazione gliceridica. La composizione dei trigliceridi generalmente segue una via nella quale gli acidi grassi saturi occupano le posizioni corrispondenti agli ossidrilici primari (sn-1 e sn-3) del glicerolo, mentre gli insaturi, soprattutto l’oleico, esterificano l’ossidrilico secondario (sn-2). I principali trigliceridi sono (determinazione dei trigliceridi, pag. 29): POO (20%), SOO (4%), POL (5,5%), OOO (40%), OOL (7,5%). I mono- (0,1-0,2%) e di-gliceridi (2-5%) sono componenti minori (Leone *et al.*, 1988) e nell’olio d’oliva la loro presenza è dovuta in parte ad un’incompleta biosintesi da parte del frutto, ma principalmente per l’idrolisi dell’olio, causandone un abbassamento della qualità. La figura 7 mostra, come esempio di trigliceride, la tri-oleina (OOO), essendo presente nell’olio in quantità maggiori rispetto agli altri.

Figura 7 – Struttura chimica del trigliceride tri-oleina (OOO).



- Gli **acidi grassi liberi** nell'olio d'oliva rappresentano la quota acidica non esterificata con il glicerolo ed il loro contenuto percentuale varia in base a diversi fattori ambientali e tecnologici. Il loro contenuto totale è espresso in % in peso di acido oleico e rappresenta il grado di acidità (determinazione dell'acidità, pag. 27), il cui valore, insieme ad altri indici, viene utilizzato per la classificazione degli oli nelle varie categorie merceologiche (classificazione merceologica, pag.27). Solo una piccola percentuale di acidi grassi si trova in forma libera nell'olio, di solito essi sono in forma esterificata, per la maggior parte con il glicerolo a dare i gliceridi (tri-, di- e mono-gliceridi) e fosfolipidi, oppure con gli alcoli alifatici e dare le cere, o strutture tecniche a dare terpeni ed esteri sterolici. In figura 6 è rappresentata la composizione acidica media di un olio di oliva vergine (determinazione degli acidi grassi, pag. 28), considerando tutti gli acidi grassi presenti, sia liberi che esterificati, ed in figura 8 sono rappresentate le formule degli acidi grassi a 18 atomi di carbonio. Gli acidi grassi liberi riducono la stabilità dell'olio, perché hanno un effetto pro-ossidante dovuto alla presenza del gruppo carbossilico libero.

Figura 8 – Formule chimiche degli acidi grassi C₁₈.



- I **componenti minori saponificabili** comprendono: le cere (esteri degli acidi grassi con gli alcoli a lunga catena) presenti nell'olio vergine di oliva in basse quantità, circa 2% (determinazione delle cere, pag. 30) e con predominanza di C₃₆ e C₃₈; i fosfolipidi (derivati dell'acido glicerofosforico) presenti in maniera ridotta negli oli di oliva rispetto agli oli di semi, circa 0,001-0,02%, ed aventi una funzione antiossidante grazie alla capacità di chelare i metalli quando l'olio è usato a temperature inferiori ai 50°C, ed agendo sinergicamente con i polifenoli ed i tocoferoli per migliorarne la loro efficienza; gli sfignolipidi (ammidi di acidi grassi con basi a lunga catena tipo la sfingosina) di cui si hanno scarse conoscenze per l'olio di oliva.

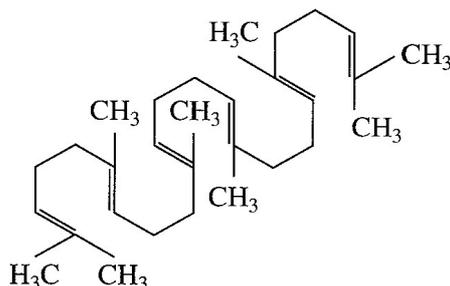
1.2.2.2 – FRAZIONE INSAPONIFICABILE

E' la componente che diversifica l'olio d'oliva vergine dagli altri oli di oliva e di semi. Comprende circa 220 sostanze, ma non tutte chimicamente identificate. Sono prodotti del metabolismo secondario della pianta e dei frutti, ma rivestono un ruolo di primaria importanza per numerosi processi biochimici e fisiologici. Questa frazione è così chiamata perché non reagisce al processo di saponificazione con l'idrossido di sodio o potassio e rimane perciò solubile in solventi apolari come l'esano e l'etere. Alcuni di questi costituenti

dell'olio di oliva hanno valore terapeutico, altri rappresentano la parte principale della nota aromatica (aromi e sapori), altri ancora sono efficaci antiossidanti naturali in grado di conferire al prodotto resistenza all'invecchiamento. Di seguito sono elencati i principali composti rappresentanti la frazione insaponificabile.

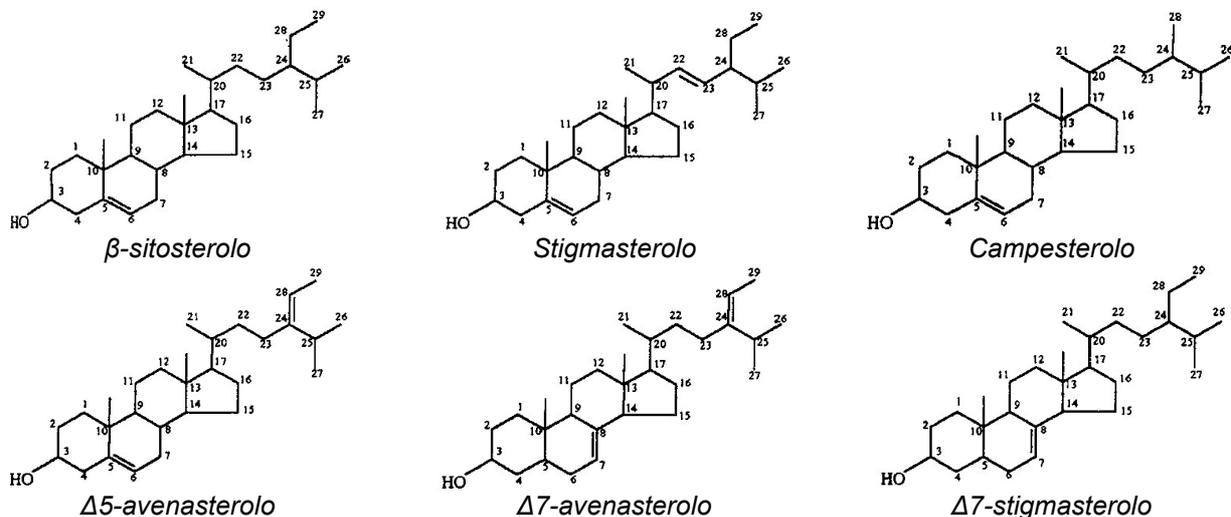
- **Idrocarburi:** rappresentano il 50-60% della frazione (determinazione degli alcani, pag. 32), esistono quelli saturi lineari (da C_{11} a C_{30}) e quelli polinsaturi. Di questi ultimi il 60-70% è rappresentato dallo squalene e la parte restante è costituita dagli idrocarburi terpenici, policiclici aromatici (IPA), e dai prodotti di neoformazione derivanti dagli steroli (idrocarburi dienici). Lo squalene $C_{30}H_{50}$ (figura 9), polimero triterpenico lineare dell'isoprene, è il più importante idrocarburo insaturo negli oli vegetali (1500-8000ppm nell'olio di oliva) perchè svolge il ruolo di precursore degli steroli (De Leonardis *et al.*, 1998).

Figura 9 – Struttura chimica dello squalene.



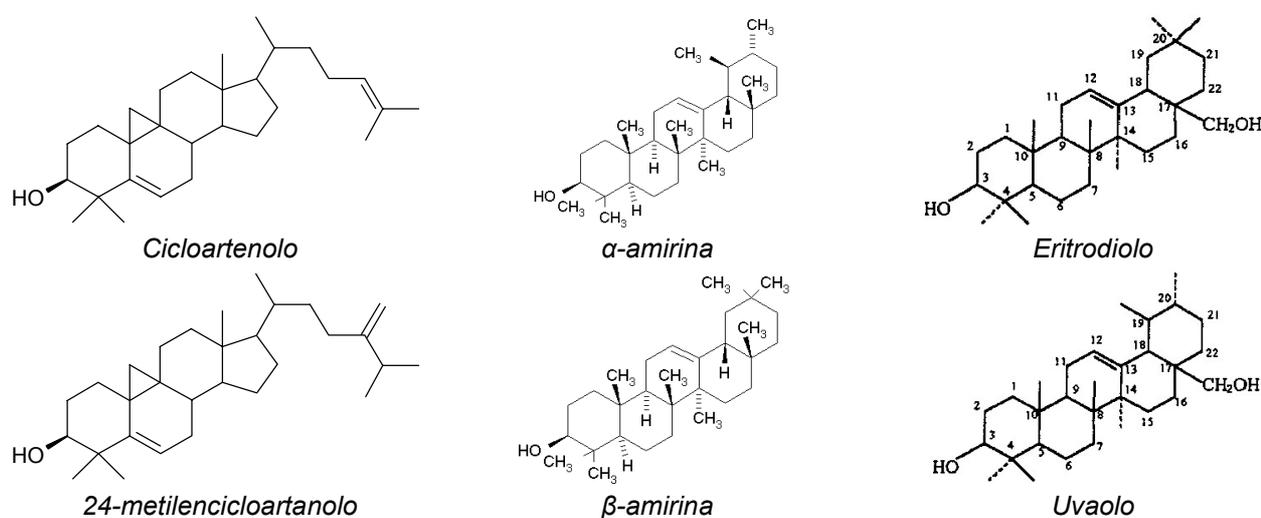
- **Steroli** (o fitosteroli): sono presenti nelle piante oleaginose in composizioni caratteristiche e differenti per ciascuna specie e comprendono una serie di composti con struttura molecolare analoga; la differenza tra loro risiede nel numero e posizione dei doppi legami, e nella natura della catena laterale R (determinazione degli steroli, pag. 29). Il contenuto in steroli totali nell'insaponificabile degli oli di oliva è circa del 4-5%. Gli steroli liberi e legati possono migliorare la stabilità ossidativa degli oli durante il riscaldamento e la conservazione ossidandosi loro stessi ed evitano la formazione dei radicali liberi, svolgendo un ruolo di antiossidanti naturali e di inibitori del processo d'irrancidimento dell'olio. In figura 10 sono rappresentate le strutture del β -sitosterolo, stigmasterolo, campesterolo, $\Delta 5$ -avenasterolo, $\Delta 7$ -avenasterolo e $\Delta 7$ -stigmasterolo.

Figura 10 – Formule chimiche di alcuni steroli.



- **Alcoli:** alifatici, di- e tri-terpenici (determinazione degli alcoli, pag. 29). Gli alcoli triterpenici sono intermedi biogenetici delle trasformazioni che interessano lo squalene e che conducono alla formazione degli steroli e costituiscono l'impronta digitale dell'olio. L'olio di oliva contiene circa 0,1-0,3% di alcoli triterpenici, mentre il contenuto degli alcoli alifatici varia da 0,01-0,02%, nell'olio di oliva estratto per spremitura, fino a 0,07% in quello estratto con solvente (aumento dovuto all'idrolisi delle cere). L'alcol diterpenico presente nell'olio di oliva è il fitolo, derivato dall'idrolisi della clorofilla. Sono presenti, inoltre, anche 2 dialcoli triterpenici, l'eritrodiole e l'uvaolo, importanti per determinare le frodi, in quanto l'olio ottenuto per pressione ne contiene piccole quantità (meno del 4,5% sul totale della frazione sterolica e dialcolica) rispetto all'olio ottenuto per estrazione con solvente. In figura 11 sono rappresentate le strutture del cicloartenolo, del 24-metilencicloartanolo, dell' α -amirina, della β -amirina, dell'eritrodiole e dell'uvaolo.

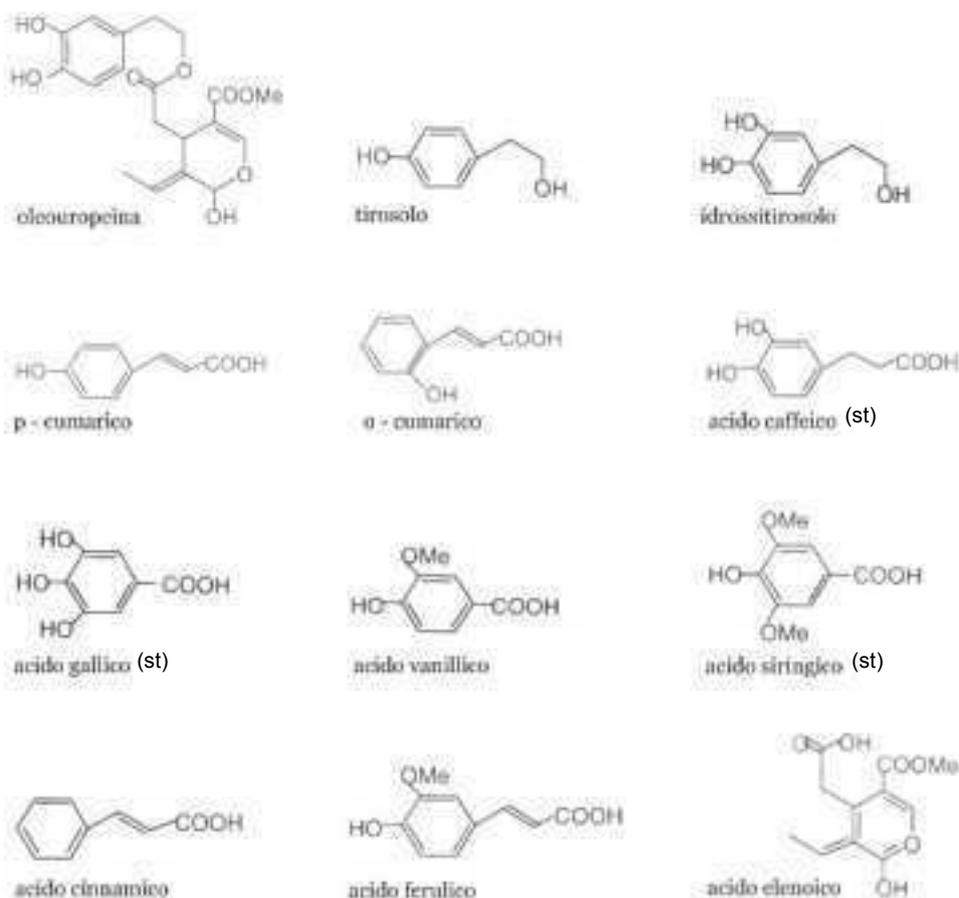
Figura 11 – Formule chimiche di alcuni alcoli e dei due dialcoli triterpenici presenti nell'olio vergine di oliva.



- **Polifenoli:** differiscono strutturalmente da quelli contenuti nel mesocarpo delle olive. Il loro aspetto qualitativo nel frutto (Botia *et al.*, 2001; Robards *et al.*, 1999) varia con la cultivar, le condizioni climatiche e pedologiche dell'ambiente, mentre nell'olio il loro contenuto è influenzato anche dall'epoca di raccolta, dalla tecnologia di estrazione e dalla conservazione dell'olio (Amiot *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1998a e 1999a). Con la maturazione del frutto l'aglicone oleuropeina diminuisce, mentre i fenoli semplici responsabili della colorazione nera-violacea dell'epicarpo e della polpa aumentano fino all'invasatura, per poi diminuire. I polifenoli sono trasferiti nell'olio sia quando il frutto è integro, sia durante il processo di estrazione. Quest'ultimo provoca in generale una riduzione più o meno accentuata della concentrazione iniziale, a seconda della tecnologia usata (i frangitori metallici hanno una capacità estrattiva maggiore rispetto ai mulini in pietra), dell'effetto solubilizzante dell'acqua di vegetazione, e del processo di ossidazione (lungi periodi di gramolazione ne diminuiscono il contenuto). I polifenoli sono metaboliti secondari accumulati in forma glucosidica; contengono un anello aromatico supportato da uno o più sostituenti idrossilici; sono sostanze anfotere, cioè molto solubili in acqua e poco in olio, per cui la loro idrosolubilità, caratteristica che li differenzia da tutte le altre sostanze dell'insaponificabile, fa sì che durante l'estrazione una parte consistente di polifenoli venga allontanata con le acque di vegetazione. È noto, inoltre, che le azioni enzimatiche che intervengono durante le diverse fasi della lavorazione ne determinano la scissione in molecole più semplici rispetto a quelle che si trovano nell'oliva. Gli oli di oliva vergini contengono sia composti fenolici semplici (fenoli derivati dall'acido benzoico, dell'acido cinnamico e

dell'alcol fenetilico) soprattutto tirosolo ed idrossitirosolo, che complessi (agliconi con fenoli semplici) principalmente oleuropeina, in quantità apprezzabili tra 50ppm e 500ppm (determinazione dei polifenoli, pag 34), alcuni sono rappresentati in figura 12. I polifenoli presenti nell'olio hanno diverse funzioni (Arrigo e Rondinone, 1995; Baldioli *et al.*, 1996; Caponio *et al.*, 2001): proteggono gli acidi grassi insaturi dall'ossidazione favorendo le azioni biologiche e fisiologiche esplicate da tali sostanze nell'organismo; esercitano un'azione antiossidante e "radical scavenger" in vivo, cioè un effetto protettivo contro fenomeni degradativi di varia natura causate dalla presenza di radicali liberi nell'organismo; contribuiscono a garantire nel tempo la stabilità dell'olio, cioè un aumento della "shelf life", e quindi della qualità nutrizionale, proteggendo il lipide da processi degenerativi di tipo ossidativo; concorrono a formare il "bouquet" degli oli vergini, in quanto i fenoli sono responsabili del gusto amaro e della sensazione di piccante in concentrazioni comprese tra 200-300ppm. L'attività antiossidante nell'olio dei polifenoli semplici e complessi è dovuta: alla proprietà di bloccare i radicali liberi (donando un idrogeno) formati durante la fase di propagazione dell'ossidazione (alterazioni, pag. 25); all'abilità di allontanare sia le specie attive ossigenate che elettrofile, e di inibire la nitrosazione e chelazione degli ioni metallici; ed infine alla capacità di modulare certe attività enzimatiche cellulari.

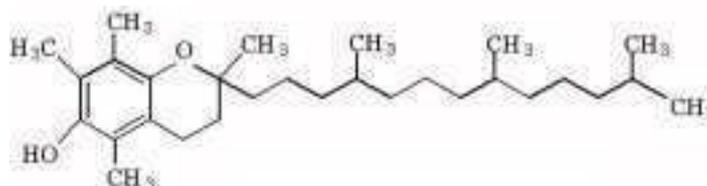
Figura 12 – Principali fenoli presenti nell'olio vergine di oliva e standard usati per la determinazione.



- **Tocoferoli**: sono composti eteroacidi ad alto peso molecolare, sono stati identificati e designati come α , β , γ e δ tocoferolo. Il contenuto di tocoferoli nell'olio vergine di oliva varia da 5 a 15 mg/100 g, la forma α (figura 13) è il principale (60-90%), detta anche vitamina E, seguita dalla forma β (15-20%) e γ (10-25%). Il

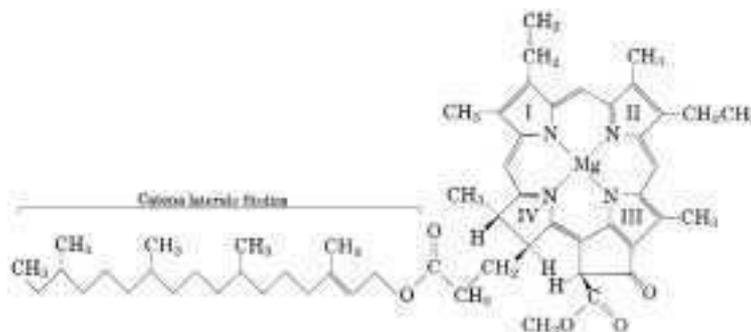
quantitativo di tocoferoli nell'olio (determinazione dei tocoferoli, pag. 34) è molto variabile, sia perché nel frutto subiscono una costante diminuzione nel corso della maturazione, sia perché le tecniche di lavorazione hanno capacità estrattive diverse. I tocoferoli hanno un duplice interesse, possiedono attività vitaminica e sono degli antiossidanti naturali inibendo il processo di irrancidimento dell'olio. La loro attività antiossidante dipende dalla concentrazione e dalla presenza di composti sinergici (polifenoli), agiscono da "spazzini" dei radicali liberi e da "sequestratori" dell'ossigeno.

Figura 13 – Struttura dell' α tocoferolo.



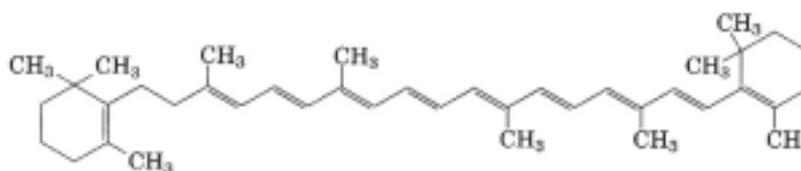
- Pigmenti:** sono responsabili del colore dell'olio di oliva (determinazione del colore e dei pigmenti, pag. 34) e sono costituite dalle clorofille e dai carotenoidi (Gandul-Rojas *et al.*, 1996b e 2000; Minguéz-Mosquera *et al.*, 1990 e 1991). Nella maturazione della drupa si succedono numerose variazioni di colore: inizialmente predomina il verde intenso, che tende a schiarirsi fino al giallo, ed in seguito compaiono macchie rosse, fino alla totale colorazione nero-violacea dei frutti. Durante l'estrazione dell'olio dalle olive si verifica una diminuzione della quantità totale di pigmenti, le clorofille diminuiscono trasformandosi in feofitine. Anche in fase di conservazione dell'olio si verifica un decremento delle concentrazioni in pigmenti (Psomiadou and Tsimidou, 2001). Nell'olio vergine di oliva sono maggiormente presenti le clorofille a (4-7%) e b, ed i loro prodotti di demolizione senza magnesio, le feofitine a (20-40%) e b, ed impartiscono all'olio una colorazione verde intensa. Hanno una struttura policiclica planare ed una lunga catena fitolica, il sistema eterociclico che circonda il Mg^{2+} ha una struttura polienica estesa, con un'alternanza di legami singoli e doppi, questi polieni assorbono la luce nella regione visibile tra 630-710nm assorbendo i colori arancione-rosso e riflettendo quelli complementari blu-verdi. La clorofilla b si differenzia dalla clorofilla a (figura 14) per la presenza di un gruppo aldeidico al posto di un gruppo metilico legato all'anello II. La quantità di clorofille negli oli varia da 1 a 50ppm e dipende da molti fattori, quali la cultivar, il grado di maturazione, la tecnologia di estrazione e la conservazione (dopo 6-7 mesi scompare la tonalità verde per la distruzione della clorofilla). Le clorofille e derivati hanno un effetto pro-ossidante in presenza della luce, in quanto trasferiscono l'energia della luce all'ossigeno ed alle molecole, innescando il processi di ossidazione, mentre al buio agiscono come antiossidanti.

Figura 14 – Struttura della clorofilla a.



I carotenoidi sono caratterizzati dalla presenza di più gruppi isoprenici, il loro colore varia dal giallo-arancione al rosso-viola, assorbendo le radiazioni luminose tra 400-500nm nella regione del blu-verde, e finora ne sono stati isolati circa 70. I più diffusi sono l' α -, il β - (5-15%, figura 15) ed il γ -carotene e vengono chiamati anche pro-vitamina A in quanto precursori della stessa e per cui assumono un importante valore nutrizionale. Accanto ai carotenoidi si possono prendere in considerazione altri pigmenti ad essi affini, come le xantofille, la luteina (30-60%), la violaxantina, la neoxantina ed il licopene. Il tenore di carotenoidi nell'olio vergine di oliva varia da 1 a 30ppm e dipende da molti fattori, come l'ambiente, la tecnologia di estrazione ed il sistema di conservazione (Zonta e Stancher, 1987). I carotenoidi alla luce agiscono come pro-ossidanti in quanto assorbono le radiazioni, che vengono successivamente cedute come calore all'ossigeno innescando le reazioni di ossidazione, al contrario mantenendo l'olio al buio senza mai esporlo alla luce, tali sostanze risultano antiossidanti.

Figura 15 – Struttura del β -carotene, precursore di 2 molecole di vitamina A.



In definitiva, quindi, si può affermare che in presenza della luce le clorofille ed i carotenoidi agiscono sull'olio come pro-ossidanti, in quanto catturano l'energia luminosa e la trasferiscono all'ossigeno, mentre al buio ed a basse temperature sono antiossidanti e proteggono l'olio dai fenomeni di ossidazione, in sinergia con i polifenoli e tocoferoli (Fakourelis *et al.*, 1987; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1992a).

- **Composti aromatici:** sono prodotti del metabolismo secondario attraverso le vie biochimiche della lipossigenasi in concentrazioni differenti, in base alla cultivar ed all'estrazione (Angerosa *et al.*, 1999 e 2000b;), e sono costituiti da aldeidi, terpeni, esteri, chetoni, alcoli, idrocarburi, eteri (determinazione dei composti volatili, pag. 32). Gli aromi originari (alcoli alifatici, alcoli di- e tri- terpenici e loro esteri) sono già presenti nel frutto, mentre gli aromi di derivazione (aldeidi, chetoni, alcoli C₅ e C₆ sature ed insature) si formano nel corso della lavorazione delle olive per effetto di meccanismi endogeni, dovuti all'attivazione di enzimi come la lipossigenasi. L'insieme di questi composti volatili determinano la nota aromatica ("flavor", specifico di ciascun tipo di olio) influenzando la valutazione edonistica (Kiritsakis, 1998). La nota predominante di un olio di pregio è data dall'aldeide insatura *trans*-2-esenale, responsabile dell'aroma intenso di verde-erbaceo. Vi sono sostanze di cui sono sufficienti tracce per essere fortemente percepite all'analisi sensoriale, mentre altre, pur presenti in dosi molto più elevate, lo sono in misura di gran lunga minore. Il "flavor" positivo è caratterizzato da: presenza di aldeidi ed alcoli C₆, che contribuiscono alla sensazione delle note verdi dell'olio vergine; presenza di esteri, che contribuiscono alla sensazione di fruttato; assenza di aldeidi, anche con soglie odorose basse, che contribuiscono al tipico odore di rancido degli oli ossidati, come la nonanale. Negli oli soggetti all'ossidazione chimica appaiono nuovi composti volatili e le caratteristiche sensoriali piacevoli dell'olio inizialmente presenti vengono ad essere sovrapposte o sostituite dagli attributi sensoriali indesiderabili. La presenza di difetti nell'olio vergine di oliva può essere dovuta a molecole che si sviluppano durante la sovraturazione dei frutti, o durante le reazioni di ossidazione degli acidi grassi insaturi, oppure da metaboliti rilasciati dalle muffe e dai batteri.

• **Composti minori insaponificabili:** sono costituiti da vitamine liposolubili, ubichinoni e metalli. Le vitamine liposolubili, contenute in quantità variabili nell'olio di oliva, sono: la vitamina A (derivata dall' α -, β - e γ -carotene, essa è essenziale per la crescita, la vista e per un corretto funzionamento del tessuto epiteliale); la vitamina D₂ (che per la sua struttura chimica si può considerare derivata dagli steroli e presenta attività antirachitica); la vitamina K (possiede azione antiemorragica); e la vitamina E, o α -tocoferolo (protettrice degli epitelii). Gli ubichinoni, noti anche come coenzima Q, sono largamente rappresentati in natura. L'olio di oliva vergine ne contiene quantità variabili da 0 a 40ppm in funzione dell'epoca di raccolta, del processo di lavorazione e del periodo di conservazione dell'olio. I metalli (ferro, rame, nichel, cobalto, cromo, alluminio, ecc.) sono presenti in bassissime concentrazioni (in tracce) ed hanno un effetto deleterio sulla stabilità ossidativa dell'olio. Essi agiscono direttamente (come trasportatori di elettroni nelle reazioni redox) o indirettamente (attivando l'ossidazione degli acidi grassi, riducendone la stabilità ossidativa ed accelerando lo sviluppo della rancidità). La reazione dei metalli è complessa e dipende da molti fattori come: la specificità del metallo verso il complesso, la valenza, la concentrazione, la pressione parziale di ossigeno, il tipo di grasso e la presenza di idroperossidi.

1.2.3 – Valore nutritivo e salutistico dell'olio vergine di oliva

La presenza di sostanze ad elevato valore biologico rende l'olio vergine di oliva un olio superiore rispetto agli altri oli vegetali e di elevata qualità nutrizionale per la salute dell'uomo: il suo colore, odore e sapore acquistano una funzione fisiologica, condizionando e stimolando l'accettabilità, l'appetibilità e l'effetto gratificante del cibo, per questi motivi è considerato uno degli alimenti della dieta mediterranea (Bertrand, 2002). Il valore energetico dell'olio di oliva è di 9,456kcal per grammo, più del doppio rispetto ai protidi e glucidi (circa 4kcal/g). La digeribilità dell'olio di oliva è pari a 100 ed il coefficiente d'utilizzazione è pari al 96%, valori superiori a tutti gli altri tipi di oli vegetali e grassi animali. Per le sue caratteristiche organolettiche e per la sua peculiare composizione, l'olio di oliva è utilizzato per le più varie applicazioni alimentari: come condimento a freddo e per pietanze calde; per la preparazione di salse; per la cottura e nella frittura (rimane stabile nella composizione alle alte temperature per la presenza di antiossidanti ed il suo elevato contenuto di acido oleico). In conclusione, il pregio fondamentale dell'olio vergine di oliva è quello d'essere l'unico olio realmente fisiologico per l'alimentazione perché naturalmente dosato a misura d'uomo (Jacotot, 2001).

1.2.3.1 – BENEFICI NUTRIZIONALI

Le note di pregio per l'olio vergine di oliva sono: l'abbondanza di acido monoinsaturo oleico ω 9; la discreta quantità di acidi grassi polinsaturi, linoleico ω 6, linolenico ω 3 (detti "essenziali" perché il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli) e palmitoleico; la carenza di acidi saturi palmitico e stearico; e la presenza di vitamine liposolubili A, D, E, e K. Gli acidi grassi monoinsaturi ω 9 controllano la glicemia, e riducono il colesterolo LDL ed aumentano quello HLD; mentre gli ω 6 e ω 3 hanno proprietà protettive contro le cardiopatie coronarie, in quanto costituiscono i precursori delle prostaglandine, ormoni implicati in numerose attività biologiche, tra le quali il controllo della pressione arteriosa e l'attività dell'aggregazione piastrinica. L'olio vergine di oliva ha una funzione colecistocinetica favorendo la produzione di bile che interviene nella digestione dei grassi emulsionandoli e nell'assorbimento delle vitamine liposolubili, ed esercita un'azione protettiva contro l'ulcera gastro-duodenale e contro le gastriti di tipo ipersecretivo, perché riduce la secrezione gastrica dell'acido cloridrico e favorisce i movimenti peristaltici favorendo lo svuotamento intestinale. L'oleuropeina, inoltre, sembra avere azione coronaro-dilatatrice, anticolesterolemica e

ipoglicemica; l'idrossitirosolo ritarda l'ossidazione delle proteine LDL (uno dei fattori di rischio dell'arteriosclerosi), svolge un'azione inibitoria dell'aggregazione piastrinica e della produzione di eicosanoidi (metaboliti tossici dell'acido arachidonico); gli steroli, idrocarburi (squalene) e alcoli triterpenici intervengono sul metabolismo del colesterolo, diminuendone l'assorbimento intestinale e la sintesi endogena, ed aumentando la secrezione di acidi biliari che favoriscono le escrezioni fecali di colesterolo. L'olio di oliva, inoltre, sembra esercitare un'azione protettiva sul metabolismo ormonale.

1.2.3.2 – STABILITÀ ALL'AUTOSSIDAZIONE

Nell'olio vergine di oliva sono presenti sostanze antiossidanti (polifenoli, tocoferoli, ecc.) che inibiscono l'autossidazione e proteggono dalle lesioni provocate dai radicali (Bonina *et al.*, 1999; Castelli *et al.*, 1999; Galli and Visioli, 1999; Ussia, 1999), sia in condizioni normali di conservazione, sia durante il riscaldamento, e sia a livello di assorbimento intracellulare. I tocoferoli stabilizzano l'autossidazione quando il rapporto tra mg di vitamina E su g di acidi grassi polinsaturi è maggiore a 0,79 (nell'olio vergine è circa 2-3mg/g). L'autossidazione porta alla perdita di acidi grassi essenziali ed all'accumulo di radicali, perossidi e polimeri, che danneggiano l'organismo (distruzione vitamine, irritazioni mucose, lesione membrane, ecc.).

1.2.4 – Economia e marketing dell'olio di oliva

L'olio di oliva è un prodotto con una peculiare economia, si tratta di un grasso nobile, con un mercato differenziato dal resto di prodotti simili del settore degli oli e dalle altre materie grasse, ciò permette di collocarlo a prezzi superiori a quelli degli altri oli vegetali e grassi animali.

1.2.4.1 – MERCATO MONDIALE

Il volume commerciale dell'olio di oliva rappresenta circa il 2% degli oli vegetali edibili venduti, ma in termini di valore rappresenta il 15% circa, nettamente superiore agli altri oli in commercio. L'olivicoltura del bacino del Mediterraneo occupa oltre il 75% del mercato mondiale. I principali paesi sono: in Europa l'Italia, la Spagna (da sole superano il 65% della produzione), il Portogallo, la Francia, l'ex Jugoslavia, l'Albania e la Grecia; in Africa la Tunisia, l'Algeria, il Marocco, la Libia, l'Egitto, il Sudafrica; in America gli Stati Uniti; in Oceania l'Australia; ed in Asia la Turchia, la Siria, l'Israele, la Russia meridionale. Il 71% del consumo è centrato nella Comunità Europea, di cui il 92% è rappresentato dalla Spagna, Italia e Grecia. Il consumo pro capite annuo dei primi 6 paesi consumatori (Grecia, Spagna, Italia, Tunisia, Siria e Portogallo) è di circa 10kg. La Spagna (il 73% della produzione è localizzata in Andalusia) è il paese esportatore di olio d'oliva leader, seguito dall'Italia, dalla Grecia e dalla Tunisia. L'Italia, inoltre, è il paese importatore leader, seguita dagli Stati Uniti, dalla Spagna e dalla Francia.

1.2.4.2 – MERCATO ITALIANO

I 65% delle principali regioni produttrici sono nell'Italia meridionale e centrale: Puglia (40%), Calabria, Sicilia, Campania, Lazio, Abruzzo e Toscana. Le altre, Marche, Emilia Romagna, Veneto, Lombardia, Trentino e Friuli, hanno una produzione modesta, ma in espansione. Stime recenti indicano che il 60% della superficie olivicola italiana si trova in collina con una resa di 25,6q/ha, il 29,1% in pianura con una resa di 38,9q/ha, ed il 10,9% in montagna con una resa di 21,5q/ha. Il punto saliente dell'olivicoltura italiana sta nella variabilità dei prodotti ottenuti, a motivo delle molte cultivar e delle diverse condizioni pedo-climatiche: ne deriva quindi una diversificazione di prodotto che consente scelte diverse in base ai gusti ed alle occasioni di impiego.

1.3 – PARAMETRI ED INDICI DI QUALITÀ

Nel linguaggio corrente ed in quello specifico della letteratura scientifica, per sottolineare le proprietà di un alimento, si ricorre spesso ai termini di “qualità”, “genuinità”, “tipicità”, ecc. Definire il concetto di “qualità” è senza dubbio molto complesso, ma sicuramente indispensabile (Antolini, 1997; Cimato *et al.*, 1997 e 1999; C.O.I., 1996; Harwood and Aparicio, 2000; Magni, 1993; Paolo, 1994).

Il concetto internazionalmente accettato (Norma UNI-ISO 8402) definisce che «La qualità è l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite dei consumatori» e quindi inducono il consumatore a preferirlo rispetto ad altri prodotti in commercio. E' noto infatti che le aspettative che spingono il consumatore a fare una scelta sono rappresentate dalla genuinità alimentare, dal valore edonistico-organolettico e nutrizionale, e dalla modalità di presentazione. Accanto a queste componenti, che sono determinanti per il destino commerciale di un qualsiasi prodotto, ve ne è un'altra che prende in considerazione le caratteristiche intrinseche del prodotto stesso. Per gli alimenti che derivano da prodotti agricoli, qualità significa infatti anche conservazione delle caratteristiche presenti nel prodotto iniziale (“qualità d'ingresso”), tenendo conto dei processi di trasformazione e conservazione (“qualità di processo”). Tutti gli sforzi devono essere rivolti a preservare intatti i costituenti responsabili delle proprietà nutrizionali ed organolettiche ottenute sull'albero, per cui si può affermare che la qualità dell'olio “nasce in campo”.

Nella valutazione qualitativa (Montedoro, 1996; Pèrez *et al.*, 2001) è evidente che occorre verificare la rispondenza a determinati standard che si riferiscono ad altrettante caratteristiche del prodotto, siano esse relative alla valutazione soggettiva che oggettiva. Gli standard relativi alla valutazione soggettiva devono rendere il prodotto accettabile da parte del consumatore in base alle caratteristiche del gusto, del colore, dell'aspetto ecc., mentre gli standard relativi alla valutazione oggettiva devono garantire la sicurezza igienico-alimentare, la stabilità ed il valore nutrizionale del prodotto in base alle caratteristiche analizzate e controllate dal produttore. Va sottolineato che il concetto di qualità è “dinamico”, in quanto sarà sempre in relazione all'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecnologiche del prodotto ed alle esigenze del consumatore.

La qualità dell'olio vergine di oliva è valutata in base a 5 caratteristiche specifiche:

- **Assenza di difetti.** I difetti sono considerati attributi naturali derivati da cambiamenti delle originali proprie del prodotto, e sono causati da errori durante la coltivazione, la lavorazione e la conservazione, che alterano il prodotto. I difetti nell'olio vengono valutati essenzialmente attraverso i parametri analitici dell'acidità, del numero di perossidi e della valutazione sensoriale (panel test).
- **Purezza.** Consiste nell'assenza di residui, additivi e contaminanti xenobiotici estranei alla natura propria del prodotto, dovuti a cause accidentali, e solitamente tossici e dannosi per l'alimentazione umana. La purezza è controllata da norme di legge e si avvale di metodiche precise ed accurate sempre in via di ulteriori e continui perfezionamenti scientifici e tecnologici.
- **Genuinità.** Consiste nell'assenza di sofisticazioni e di adulterazioni nell'olio vergine. La genuinità esprime il concetto di “autentico”. Nel settore analitico e normativo si sta assistendo ad un rapido sviluppo nelle tecnologie ammesse per individuare questo tipo di frodi e si sta compiendo un importante sforzo di ricerca per migliorare le conoscenze di base.
- **Equilibrio chimico.** E' la caratteristica del prodotto di presentare livelli adeguati e rapporti bilanciati di sostanze che danno consistenza, gusto, conservabilità, salubrità ed armonia globale all'olio. Sono in atto numerosi tentativi per calcolare l'Indice Globale di Qualità (IGQ), il quale è basato su parametri oggettivi

(composti aromatici, polifenoli, tocoferoli, acidità, perossidi, composizione acidica ed assorbanze nell'UV-visibile, ecc.) equalizzati attraverso un fattore di conversione in base alla loro importanza.

- **Tipicità.** E' la caratteristica di un prodotto di possedere attributi che permangono costanti e che lo rendono facilmente riconoscibile e distinguibile dagli altri, in quanto le caratteristiche sono legate ad un'area geografica ben definita ed a sistemi di lavorazione tramandati nel tempo (Montedoro *et al.*, 1993a). La tipicità deriva dall'interazione tra matrice genetica (cultivar), tecniche agronomiche di coltivazione, ambiente, tecniche di lavorazione e di conservazione per ottenere un prodotto con caratteristiche tipiche definibili e costanti. Viene definita e controllata attraverso la combinazioni di strumenti di laboratorio ed amministrativi, quindi posso essere previsti vincoli più severi di quelli imposti dalle norme ordinarie. Su questa base sono state istituite nella Comunità Europea (regolamenti CE n° 2078, 2081 e 2082 del 1992) le Denominazioni di Origine Protetta (DOP) e le Indicazioni Geografiche Protette (IGP). Per la tipicità non è stato identificato ancora alcun parametro né sono state stabilite le metodiche analitiche atte a verificare la veridicità delle affermazioni, in quanto allo stato attuale delle conoscenze le informazioni sono troppo limitate e non ancora sufficientemente dotate dei requisiti di ripetibilità ed affidabilità in grado di riconoscere le falsificazioni di denominazione (contraffazioni), ma sono in corso importanti ricerche per in raggiungimento di tale scopo (Bianchi *et al.*, 1996 e 2001). La tipicità esprime il concetto di "caratteristico" e "tradizionale", ed in letteratura sono presenti molti lavori di ricerca svolti con il fine di caratterizzare e migliorare la qualità dell'olio vergine di oliva nelle diverse aree geografiche (Bianchi *et al.*, 2002; Cataldi Lupo *et al.*, 1995; Cristoferi, 2001; Dugo *et al.*, 2000; Esti *et al.*, 1996a e 1996b; Koprivnjak e Pribetić, 2000; Mincione *et al.*, 1994 e 1996; Motilva *et al.*, 1998; Parmegiani e Scarbolo, 2000; Poina *et al.*, 1996, 2001a, 2001b e 2001c; Procida *et al.*, 1994; Saitta *et al.*, 2000; Salvator *et al.*, 2001a e 2001b; Spugnoli *et al.*, 1998; Tous *et al.*, 1997; Zunin *et al.*, 2001;).

Queste 5 caratteristiche permettono di rendere più misurabili i requisiti che si sommano nel concetto astratto di "qualità globale" dell'olio extra vergine di oliva.

1.3.1 – Fattori che influenzano la qualità

I fattori che determinano la qualità del prodotto finale, cioè dell'olio prima del consumo, sono divisi in due gruppi (figura 16): i fattori agronomici che agiscono indirettamente sull'olivo ("qualità d'ingresso") ed i fattori tecnologici che agiscono direttamente sull'olio ("qualità di processo"). Numerose ricerche sono state compiute allo scopo di studiare l'influenza dei fattori agronomici e tecnologici sulla qualità: El-Antari *et al.* (2000); Fedeli e Cortesi (1993); Montedoro e Servili (1992); Schiratti (1999); Tombesi e Antaras (1998); Uceda (1983),

Figura 16 – Fattori che influenzano la qualità.



1.3.1.1 – FATTORI AGRONOMICI CHE AGISCONO INDIRETTAMENTE SULLA “QUALITÀ D’INGRESSO”

I fattori agronomici agiscono indirettamente sull’olivo influenzando la produzione della pianta, variandone la fisiologia della biosintesi (lipogenesi) e di accumulo di olio nei frutti (Cimato, 1988).

Questi fattori sono determinati dalla varietà, dai fattori ambientali e dalle tecniche agronomiche.

- La **cultivar** rappresenta la variabile più importante (Agar *et al.*, 1998; Campeol *et al.*, 2001; Fontanazza *et al.*, 1994; Uceda *et al.*, 1999). L’accumulo di olio nei frutti ed i rapporti tra i diversi costituenti della frazione lipidica dipendono dal controllo genetico. La cultivar influenza il profilo chimico attraverso il meccanismo di accumulo di trigliceridi diversi e formazione ed evoluzione degli altri componenti minori. L’influenza varietale sulla composizione acidica si riscontra a carico dell’acido oleico e linoleico, con sensibili modifiche del rapporto acidi saturi (poco variabili) su acidi insaturi (forti oscillazioni). La biosintesi degli acidi grassi può essere influenzata dall’interazione condizioni climatiche e fase di maturazione dei frutti. Per una migliore conoscenza dell’azione della matrice genetica e della maturazione è stata proposta la valutazione dei rapporti acido oleico su linoleico o quella tra acidi grassi insaturi su saturi. Più evidente è l’influenza della cultivar nella determinazione dei costituenti dell’insaponificabile. Gli alcoli alifatici e triterpenici, il colore dell’olio, le sostanze fenoliche, i tocoferoli ed i composti volatili possono essere considerato come indici per individuare l’origine genetica della varietà. Il contenuto in polifenoli presenta variazioni legate alla cultivar, anche se la tecnologia di estrazione ne modifica alcuni, in particolare i derivati dell’oleuropeina. Per i tocoferoli è stato osservato un comportamento analogo ai polifenoli: il contenuto è condizionato dal genotipo e si riduce con la maturazione. La frazione idrocarburica subisce notevoli variazioni in relazione alla cultivar ed a seconda dello stato di maturazione delle olive. Alcuni steroli (sitosterolo, stigmasterolo e $\Delta 5$ -avenasterolo) presentano variazioni strettamente legate alla cultivar, ma il contenuto totale decresce con la maturazione. Gli alcoli presentano contenuti e dinamiche diverse in relazione alla cultivar, ma il contenuto totale aumenta con la maturazione. In definitiva ogni cultivar dà un olio con un profilo tipico e con caratteristiche proprie anche se variabili con il procedere della maturazione.
- I **fattori ambientali**. E’ noto che l’origine geografica condiziona la composizione acidica degli oli. In Italia vi è una grande difficoltà ad interpretare i risultati analitici, in relazione a particolari condizionamenti ambientali dovuti ad un’olivicoltura tradizionale eterogenea nella struttura e nella conduzione dell’impianto, ed a causa del fattore “stagionalità” che influenza la produzione (Deidda *et al.*, 1994). L’ambiente è una zona geograficamente definita da specifiche condizioni mesoclimatiche e da proprie caratteristiche pedologiche di pendenza, esposizione, natura e profilo del suolo. La composizione acidica ed i livelli di steroli sembrano essere legati all’ambiente di origine, così come le caratteristiche sensoriali ed altri costituenti dell’olio (Angerosa *et al.*, 1996a; Montedoro *et al.*, 1995; Ranalli *et al.*, 1997 e 1999). La temperatura influenza molti processi fisiologici: la traspirazione, la respirazione, la fotosintesi, l’attività enzimatica, la divisione e la distensione cellulare, ecc., quindi interviene sulla crescita vegetativa, sulla differenziazione morfologica, sull’allegagione e maturazione dei frutti, in sostanza sulla produttività della pianta. Le zone collinari da 150-450m s.l.m. orientati ad ovest e sud-ovest risultano avere l’esposizione più idonea per la coltivazione. Il rapporto acidi insaturi/saturi degli oli settentrionali risulta più elevato di quelli meridionali perché gli acidi insaturi conferiscono alla cellula una maggiore resistenza alle basse temperature; nelle zone con climi freddi, inoltre, il contenuto in polifenoli tende a mantenersi più elevato. La luce, valutata come flusso totale di energia intercettata dalla chioma, influisce sulla produzione dell’olivo, interferendo sull’attività fotosintetica, la biosintesi di clorofille, ecc., sulla traspirazione e

sull'assimilazione degli elementi nutritivi. La quantità di luce intercettata dalla chioma dipende dalla forma di allevamento e la mancanza di luce provoca marcati effetti morfogenetici. Il vento agisce sia direttamente (rottture di rami, defogliazione, disseccamenti, raggrinzimento delle drupe, ecc.) che indirettamente sul metabolismo della pianta. La disponibilità idrica interviene sullo sviluppo e sulla produttività della pianta. Carenze idriche primaverili provocano squilibri nello sviluppo vegetativo della pianta, mentre carenze estive ed autunnali provocano danni ai frutti e bassa resa in olio (Inglese *et al.*, 1999; Stefanoudaki *et al.*, 2001).

- Le **tecniche agronomiche** vengono applicate per adeguare la conduzione della pianta all'ecosistema, per ottenere più alte rese di produzione e per migliorare la qualità dell'olio. Una razionale applicazione delle stesse permette di limitare le oscillazioni provocate dalle mutevoli condizioni stagionali ed ambientali. Nell'olivo, a differenza di altre coltivazioni arboree, non sono state evidenziate specifiche differenze derivanti dalla intensificazione colturale sulle caratteristiche dell'olio. La fertilizzazione finora è stata parzialmente usata per misurarne l'influenza qualitativa sull'olio; un aumento di fertilizzanti, soprattutto azotati, incrementa la crescita e l'allegagione, induce un ritardo relativo nell'accumulo di olio, ed influenza le caratteristiche delle drupe in modo analogo a quanto si verifica nelle annate di carica; si ritiene che i parametri dell'olio non siano facilmente influenzabili (Frega *et al.*, 1995; Ismail *et al.*, 1999a; Metzidakis *et al.*, 1999). Trattamenti fogliari con urea non hanno modificato la composizione acidica, ma hanno aumentato il contenuto di polifenoli e tocoferoli nell'olio, aumentandone di conseguenza la stabilità ossidativa e la qualità organolettica e nutrizionale. L'irrigazione esercita una forte influenza sulla vegetazione, sulla produzione (aumento del numero di frutti) e sull'accrescimento del frutto, influenzando così la quantità e la qualità dell'olio: aumento della clorofilla, del contenuto di alcoli e steroli, e diminuzione delle sostanze fenoliche e dei composti volatili che contribuiscono alla formazione del profumo. La composizione acidica sembra non correlata con il regime irriguo. Un'adeguata presenza di acqua nel terreno, inoltre, ridurrebbe il fenomeno dell'alternanza di produzione (D'Andria *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1999b; Motilva *et al.*, 1999 e 2000; Patumi *et al.*, 1999; Tovar *et al.*, 2001). La potatura consente di modificare il modo spontaneo di vegetare della pianta al fine di adattarla alle tecniche colturali e di equilibrare la funzione vegetativa con quella produttiva, regolando l'efficienza dell'albero (massimo rendimento) e per contenere il fenomeno dell'alternanza. Le forme di allevamento (monocono e vaso) non hanno evidenziato differenze nelle caratteristiche analitiche degli oli. Recenti studi metterebbero in luce una influenza negativa del carico non solo sulla resa in olio, ma anche sul contenuto in composti fenolici e resistenza all'ossidazione. La difesa fitosanitaria mira alla conservazione dell'integrità della pianta e dei frutti contro i parassiti (Iannotta *et al.*, 1999). Un insetto molto dannoso è la "Mosca dell'olivo" che attacca la drupa quando è già formata provocando perdite della produzione e rendendo l'olio non commestibile a causa dell'aumento progressivo dei processi idrolitici (Soriano Martin, 1996): aumento dell'acidità, del numero di perossidi e degli indici spettrofotometrici, modifiche della composizione sterolica ed alcolica, riduzione del contenuto totale con variazioni compositive dei polifenoli, alterazione dei composti volatili e presenza di difetti organolettici (sapore di verme). Tale fenomeno può essere dovuto in parte al contatto con enzimi idrolitici (lipasi) ed in parte all'attività lipolitica di batteri e funghi che si insediano nelle olive infestate. Gutiérrez-Rosales *et al.* (1999a) hanno studiato, inoltre, l'influenza della coltivazione biologica sulla qualità dell'olio vergine di oliva.

1.3.1.2 – FATTORI TECNOLOGICI CHE AGISCONO DIRETTAMENTE SULLA “QUALITÀ DI PROCESSO”

I fattori tecnologici comprendono la lavorazione e la conservazione, agiscono direttamente sull'olio influenzando la resa di estrazione e variando i livelli ed i rapporti compositivi dell'olio ottenuto e conservato.

- Il **processo di lavorazione** influisce sulla qualità, causando la variazione di alcuni composti chimici (fenoli, pigmenti, sostanze volatili, ecc.), ma senza influenzare significativamente i valori di acidità, perossidi ed indici spettrofotometrici nell'UV (Ben Miled *et al.*, 2000; Caponio *et al.*, 2000; Di Giovacchino *et al.*, 1997 e 2001; Frega *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999). Il sistema di raccolta più idoneo è quello in grado di minimizzare i danni provocati alle drupe, in quanto il distacco del frutto è un evento traumatico che può determinare danni alla struttura del frutto esponendolo a fenomeni di ossidazione. I sistemi di raccolta possono modificare la composizione chimica dell'olio e quindi la sua qualità (Calafatello *et al.*, 1999; Zimbalatti, 1996). L'epoca di raccolta dovrebbe essere determinata dalla maturazione dei frutti. Sul tipo ed entità delle variazioni chimico-fisiche dell'olio durante la maturazione, in letteratura i dati non sono concordi (Finotti *et al.*, 2001; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1999b; Morales *et al.*, 1996; Yacine *et al.*, 2001). Durante la maturazione si registra una riduzione pressoché generalizzata di tutte le componenti non gliceridiche dell'olio, fatto che rende opportuno un anticipo delle operazioni di raccolta. Per quanto riguarda la composizione acidica, il contenuto di acido oleico sembra rimanere costante nel tempo, mentre gli acidi grassi saturi stearico e palmitico sembrano diminuire, in particolare nelle zone fredde, a favore degli acidi grassi insaturi linoleico e linolenico. Col progredire della maturazione dei frutti diminuisce nell'olio la quantità di composti minori. Tra gli idrocarburi, lo squalene scende di circa il 10%; gli alcoli mostrano un andamento a campana; i tocoferoli diminuiscono del 25% a distanza di 2 mesi; i pigmenti, clorofilla e β -carotene calano nel tempo in funzione della velocità di caduta del cromoplasto del frutto; gli steroli totali diminuiscono e variano di composizione; diminuiscono anche i polifenoli totali, cambiando anche la loro distribuzione; i composti aromatici seguono un andamento a campana, con il massimo spostato verso l'invasatura del frutto (Angerosa and Basti, 2001; Olias *et al.*, 1980). Il momento ottimale per la raccolta, sotto il profilo quanti-qualitativo dell'olio (Rahmani *et al.*, 1997), si verifica quando il 75% delle olive sulla pianta risultano invaiate, quindi prima del completamento della maturazione fisiologica. La valutazione del colore dell'epidermide e della polpa è uno dei metodi usati per definire l'indice di maturazione delle olive. Il trasporto delle olive deve essere predisposto usando contenitori-cassette che consentano la creazione di strati di spessore non troppo elevato (circa 25cm) e che consentano l'accatastamento senza provocare compressioni. Durante la conservazione dei frutti gli enzimi nei frutti possono causare: un'azione idrolitica (dovuta alle lipasi) ed una ossidativa (dovuta alle lipossidasi). I due fattori determinanti sono: l'integrità del frutto, che evita il contatto dell'olio (racchiuso nei vacuoli) con gli enzimi (dispersi nel citoplasma) ed impedisce il contatto con l'ossigeno, ed il tempo di conservazione che fa aumentare esponenzialmente i fenomeni idrolitici ed ossidativi. Le caratteristiche organolettiche, inoltre, decadono con velocità maggiore se i frutti sono lesionati, pertanto le olive vanno lavorate subito dopo la raccolta od al massimo entro 1-2 giorni, conservandole in luoghi asciutti, freschi e ben areati. E' stata valutata, infine, la qualità dell'olio ottenuto da olive conservate in differenti condizioni ottenendo diversi risultati (Gardiman *et al.*, 1999; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2000; Kiritsakis *et al.*, 1998; Koprivnjak *et al.*, 2000). La mondatura serve per separare le olive da tutti i materiali estranei (foglie, rami, sassi, ecc.) ed il lavaggio con acqua prima dell'estrazione permette una pulizia superficiale dei frutti dalla terra, dai residui di trattamenti fitosanitari, ecc., evitando che l'olio assuma colori e sapori anomali e sgradevoli. I sistemi di estrazione si possono

schematizzare in funzione del meccanismo di rottura dell'oliva ed in funzione del sistema di separazione dell'olio dalla restante parte del frutto. La frantumazione (o molitura) delle olive ha lo scopo di far fuoriuscire l'olio contenuto nei vacuoli cellulari. La rottura del frutto può essere ottenuta con 2 tecnologie diverse: con frangitori in pietra (molazze) e con frangitori metallici (a martelli ed a dischi). L'uso delle molazze rompe la drupa schiacciando la polpa, riducendo la frantumazione dei noccioli e della buccia, ed evitando innalzamenti di temperatura, per cui consente l'ottenimento di oli meno ricchi in sostanze volatili e fenoliche, e quindi meno amari e piccanti. I frangitori metallici rendono la pasta più omogenea, disperdono maggiormente l'olio, sono veloci, agevolano la pulizia, ma innalzano la temperatura modificando alcune caratteristiche organolettiche dell'olio e cambiamenti nella stabilità e nel contenuto in antiossidanti (Angerosa e Di Giacinto, 1995). Il sistema di frangitura modifica significativamente anche le caratteristiche cromatiche dell'olio: i frangitori metallici danno oli con contenuti più alti di clorofille e carotenoidi rispetto a quelli ottenuti con un mulino di pietra. La gramolatura (rimescolamento della pasta di olive) risulta indispensabile per favorire la coalescenza delle goccioline oleose in unità di maggiori dimensioni, meno prone a subire gli attacchi enzimatici. In questa fase infatti sono attivate le reazioni enzimatiche che danno luogo a processi ossidativi e si modificano i rapporti nel frazionamento dei composti minori dell'olio, con un aumento delle aldeidi ed una diminuzione della carica fenolica totale. E' importante che la temperatura sia contenuta tra i 25° e 30°C ed il tempo sia tra i 30 e 90 minuti a seconda delle proprietà reologiche della pasta di olive (Angerosa *et al.*, 2001; Salas and Sanchez, 1999). Un aumento della clorofilla totale, e quindi del colore verde, è osservato negli oli estratti da paste gramolate rispetto a quelle ottenute solamente dalla frangitura e pressatura. La separazione dell'olio può avvenire attraverso tre vie: separazione tra sansa e mosto per pressione (pasta deposta tra fiscoli sottoposti a sistemi idraulici con pressioni di 350-400 atm) e successivamente tra acqua di vegetazione ed olio (con centrifughe o per decantazione spontanea); separazione dell'olio dalla pasta per differenza di tensione superficiale (percolamento) attraverso un sistema filtrante selettivo, impedendo l'estrazione dell'acqua; separazione fra olio, acqua e sansa basata sulle differenze di peso specifico mediante centrifugazione orizzontale usando decanter a 3 o 2 vie in base all'aggiunta di acqua calda (o di riciclo) per favorire la separazione. Sono possibili diverse combinazioni tra sistemi di frangitura e di separazione, ed altri interventi meno diffusi per la preparazione delle paste, quali la denocciolatura, che agiscono sulla qualità finale dell'olio prodotto. La combinazione macina-pressa-centrifuga determina il maggior recupero di olio, ma è un sistema relativamente lento (discontinuo), richiede manodopera elevata e qualificata, e quindi è raramente usato. La combinazione martelli-centrifuga (continuo) è veloce, interamente meccanizzabile, di facile gestione, ma con il rischio di innalzamenti di temperatura a danno dei composti volatili ed a favore dei fenomeni ossidativi, e con la perdita, inoltre, di polifenoli attraverso l'acqua di vegetazione (uso di abbondante acqua nel decanter per diluire le paste dense). Sui diversi sistemi di ottenimento dell'olio si dispone di un'ampia letteratura (Di Giovacchino *et al.*, 1991, 1994 e 1995; Ranalli *et al.*, 1996, 2000, 2001a e 2001b; Servili *et al.*, 2000; Uceda *et al.*, 1994) e sono noti i riflessi che ogni sistema esercita sull'acidità dell'olio, sui suoi componenti chimici e sulle caratteristiche organolettiche, sulla resa di estrazione, sulla compatibilità a norme di commercializzazione e su regole idonee a ridurre l'inquinamento. Da tali ricerche sono emerse piccole differenze nell'analisi chimiche degli oli, mentre all'analisi delle caratteristiche organolettiche il sistema martelli-centrifuga è risultato buono. La tecnologia di estrazione è in rapida evoluzione; attualmente si sta dirigendo verso i sistemi continui, molto veloci ed efficienti, ed all'applicazione di nuovi meccanismi, quali l'aggiunta di polveri drenanti o preparati enzimatici alle paste per accelerare e migliorare

l'efficienza dei sistemi di estrazione, oppure denocciolando le olive, o gramolando in atmosfera modificata per evitare fenomeni ossidativi. La resa di estrazione si può migliorare usando coadiuvanti che aumentano la quantità di olio "libero" nella pasta di olive (Malfatti *et al.*, 2000; Pollastri *et al.*, 2000; Ranalli *et al.*, 2001c). I coadiuvanti utilizzati sono preparati enzimatici liofilizzati con attività pectinolitica e cellulolitica, e la qualità dell'olio ottenuto non sembra essere influenzata dall'uso degli enzimi e nemmeno la composizione acidica, sterolica, alcolica, ecc., mostra avere differenze significative. Un altro coadiuvante usato è il talco minerale con proprietà lipofile, che diminuisce l'emulsione olio/acqua e quindi aumenta la resa in olio. Anche l'uso del talco non modifica la qualità dell'olio e la sua composizione chimica. La filtrazione permette la separazione di particelle che rendono l'olio torbido, le quali sono sempre accompagnate da una carica enzimatica che rende l'olio meno stabile, meno conservabile e con odori e sapori sgradevoli di "morchia" e "rancido". Il confezionamento nel breve periodo in contenitori di vetro di varia forma e colore, di lattine, di alluminio o di banda stagnata, opachi e ben chiusi, impedisce all'olio, estremamente sensibile agli agenti esterni (luce, aria, calore), di alterarsi, mantenendosi di alta qualità per il più lungo periodo di tempo possibile. I piccoli contenitori devono essere efficienti nel bloccare la luce, l'ossigeno (evitando travasi e continue miscele con l'aria) e l'umidità, mentre l'ambiente di conservazione deve essere fresco ed asciutto, onde evitare innalzamenti di temperatura che favoriscono l'ossidazione dell'olio.

- La **conservazione** assume un aspetto importante nella prospettiva di mantenere intatta la qualità dell'olio. Premesso che la conservabilità dell'olio extra vergine d'oliva è la più lunga nell'ambito dei grassi alimentari (grazie alla sua composizione acidica e al patrimonio antiossidante), essa non è però infinita, soprattutto in relazione alle qualità organolettiche, che si affievoliscono con il tempo. Le buone regole di conservazione sono: temperature di immagazzinamento basse (12-15°C); assenza di residui (acqua di vegetazione, sospensioni di particelle di sansa); assenza di luce ed in particolare di radiazione ultravioletta; materiale dei contenitori inattaccabile (acciaio inossidabile, vetro, ecc.); assenza di aria nel contenitore (riempimento dello spazio di testa con gas inerti ed atossici, tipo azoto). Baldini *et al.* (1996), Capella *et al.* (1981), Cinquanta *et al.* (1997), Gasparoli *et al.* (1990 e 1991), Mincione e Poiana (1999), Sanelli (1981a, 1981b, 1981c e 1981d) hanno effettuato prove di conservazione ottenendo risultati differenti tra di loro.

1.3.2 – Salvaguardia e tutela della qualità

Proporre al consumatore olio vergine di oliva di qualità vuol dire garantirgli le caratteristiche che lo definiscono, difendendolo e proteggendolo dalle frodi, dai difetti e dalle alterazioni sul prodotto venduto.

1.3.2.1 – FRODI

Si ha frode quando viene immessa sul mercato, a scopo di illecito guadagno, una merce diversa da quella dichiarata, o per qualità, o per quantità, o per origine e provenienza.

- L'**adulterazione** consiste nel variare le percentuali dei componenti dell'olio extra vergine senza alterare la natura, o per aggiunta o per sottrazione di un principio attivo. Questo accade, per esempio, deodorando e deacidificando l'olio per togliere i sapori ed odori sgradevoli, ed abbassando l'elevata acidità. I processi di rettifica più energici, inoltre, modificano la composizione dell'olio alterandone la configurazione.
- La **contraffazione** consiste nel sostituire totalmente un prodotto con un altro di minor pregio (olio di semi venduto per olio di oliva), oppure nel falsificare le dichiarazioni in etichetta delle Denominazioni di Origine Protette (DOP) e delle Indicazioni Geografiche Protette (IGP) di un olio extra vergine.

- La **sofisticazione** consiste nell'aggiunta di prodotti di minor pregio nell'olio di oliva. L'aggiunta di olio di nocciola, o di semi, o di sintesi sono alcuni esempi.

1.3.2.2 – DIFETTI

I difetti dell'olio sono dovuti ad odori e sapori anomali causati da non idonei processi agronomici, da attacchi parassitari, da sistemi di raccolta dannosi, da un'errata tecnologia di estrazione (temperature elevate, impianti nuovi, ecc.) o da una conservazione inadatta. Nel corso delle varie fasi del processo produttivo e durante la sintesi lipidica nel frutto possono verificarsi particolari condizioni che alterano la composizione chimica dell'olio e incidono sulle caratteristiche sensoriali olfatto-gustative a causa della presenza di sapori ed odori-aromi sgradevoli. I principali difetti che si possono originare nel corso delle diverse fasi di produzione dell'olio sono: difetti acquisiti dal frutto durante la maturazione (verde, secco, aspro), difetti acquisiti per inadeguate pratiche di raccolta o di stoccaggio delle olive (terra, muffa, avvinato, riscaldamento), difetti dovuti a tecniche di estrazione dell'olio inadeguate (fiscolo, cotto, metallico, acqua di vegetazione) e difetti dovuti a conservazione inadeguata dell'olio (rancido, morchia, putrido, cetriolo).

1.3.2.3 – ALTERAZIONI

Le alterazioni sono deterioramenti dovute alla presenza di: ossigeno, insaturazioni, metalli, enzimi, luce, calore, pigmenti e microrganismi. Tutte possono operare ed agire simultaneamente e sinergicamente.

L'ossidazione inizia quando ancora l'olio è nei frutti, e continua durante il processo di estrazione e la conservazione (Monografia *Metrohm Italiana*). L'olio di oliva è considerato molto resistente all'ossidazione a causa del basso contenuto di acidi grassi polinsaturi e per la presenza di antiossidanti naturali come i tocoferoli ed i polifenoli (Nissiotis and Tasioula-Margari, 2001; Okogeri and Tasioula-Margari, 2001).

L'inacidimento (o irrancidimento idrolitico) è l'idrolisi dell'olio che porta alla liberazione degli acidi grassi dai trigliceridi per azione microbica e/o enzimatica delle lipasi; questa alterazione aumenta l'acidità dell'olio.

L'irrancidimento è l'ossidazione degli acidi grassi con la formazione di perossidi ed idroperossidi (ossidazione primaria), di sostanze volatili (ossidazione secondaria), e di polimeri.

- L'**ossidazione primaria** può avvenire per cause e con meccanismi diversi: la degradazione biochimica è data da processi enzimatici, la fotossidazione è causata dall'energia luminosa, e l'autossidazione, di natura chimica, è dovuta alla luce, al calore, ai metalli come catalizzatori.

L'autossidazione, o degradazione chimica, è la causa più importante del deterioramento degli oli e dei grassi (Rovellini *et al.*, 1997). Il meccanismo dell'autossidazione è descritto come un processo a più fasi (figure 17 e 18). Nella fase di attivazione i radicali liberi si formano direttamente dai componenti lipidici attraverso il coinvolgimento degli attivatori (A) come: le radiazioni elettromagnetiche (luce, in particolare quella ultravioletta), il calore dato dalle alte temperature, i pigmenti e gli ioni metallici. Gli attivatori agiscono sul carbonio alfa del doppio legame oppure agiscono sul gruppo carbossilico; in questa fase si assiste ad un lento e progressivo assorbimento di ossigeno, ad un leggero aumento del numero di perossidi ed ad una diminuzione degli acidi grassi. Questa fase è contrastata dalle sostanze antiossidanti che bloccano o rallentano la cascata delle reazioni a catena agendo sui radicali liberi ossidandosi esse stesse generando composti perossidici di natura più stabile perché stabilizzati dalla risonanza. La funzione antiossidante viene ad esaurirsi nel tempo e finché è attiva essa determina il periodo di induzione terminando con il punto di "rancidità". Nella fase di propagazione si innescano simultaneamente delle reazioni a cascata in base all'ossigeno disponibile ed alle insaturazioni degli acidi grassi, dovute ai gruppi

1.3.3 – Controlli analitici bromatologici per la valutazione della qualità

La qualità dell'olio vergine di oliva dichiarata in etichetta (purezza, genuinità, tipicità, ecc.) è diventata un fattore importante sia dal punto di vista commerciale che salutistico (Piacenti, 1999). L'olio di oliva sta acquistando sempre più popolarità grazie ai suoi benefici nutrizionali derivati dalla sua composizione e dai suoi controlli severi. L'alto prezzo dell'olio di oliva è dovuto ai costi di produzione, alla bassa offerta di mercato ed all'aumento della domanda del consumatore. I consumi complessivi di olio vergine di oliva tendono ad aumentare, ma la produzione non cresce in proporzione alla domanda, per cui la conseguenza a tale situazione è il diffondersi di frodi ed un aumento non sempre giustificato del prezzo. La tutela e la garanzia della qualità assumono una grande importanza nel settore analitico bromatologico, pertanto è stato necessario definire le caratteristiche compositive dell'olio di oliva ed i metodi di controllo. Le tecniche strumentali, in particolare i metodi cromatografici in fase liquida e gassosa, sono le principali metodiche che possono essere usate anche come mezzi per quantificare e monitorare la qualità dell'olio grazie ai dettagliati risultati a riguardo della composizione qualitativa e quantitativa. La continua conoscenza ed innovazione di tecniche analitiche, affiancate a quelle tradizionali, permette un controllo più preciso ed una maggior sicurezza (Aparicio *et al.*, 1997 e 2000; Cert *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 1998b Stefanoudaki *et al.*, 2000).

1.3.3.1 – METODICHE ANALITICHE OBBLIGATORIE

I regolamenti CE 2568/91, 356/92, 1683/92, 183/93, 656/95, 2472/97, 1513/01 e 1989/03 definiscono i parametri per classificare l'olio di oliva nelle diverse categorie e le metodiche analitiche per accertare la qualità ed individuare le frodi. Diversi metodi fisici e chimici sono usati per analizzare e determinare alcune classi di composti minori nell'olio vergine di oliva come indici di frodi.

Classificazione merceologica

Gli allegati dei regolamenti CE 2568/91, 356/92, 183/93, 656/95, 2472/97, 1513/01 e 1989/03 definiscono e delimitano le caratteristiche fisiche, chimiche e sensoriali delle diverse categorie merceologiche dell'olio di oliva. Le principali differenze sono:

- Gli **oli di oliva vergini** sono ottenuti mediante procedimenti meccanici o processi fisici, in condizioni che non causano alterazioni all'olio e sono classificati con diverse denominazioni in funzione dei valori analitici: extra vergine (acidità $\leq 0,8\%$); vergine (acidità $\leq 2\%$); vergine lampante (acidità $> 2\%$).
- Gli **oli di oliva raffinati** sono ottenuti dalla raffinazione degli oli vergini lampanti (acidità $\leq 0,3\%$).
- Gli **oli di oliva** derivano da tagli di oli raffinato e di oli vergini (acidità $\leq 1\%$).
- Gli **oli di sansa di oliva greggi** sono ottenuti dall'estrazione con solvente dalla sansa.
- Gli **oli di sansa di oliva raffinati** sono prodotti dalla raffinazione degli oli di sansa greggi (acidità $\leq 0,3\%$).
- Gli **oli di sansa di oliva** sono derivati da tagli di oli di sansa raffinati e di oli vergini (acidità $\leq 1\%$).

Nella tabella 1 vengono riportate le caratteristiche analitiche ed i limiti delle diverse categorie di olio di oliva riportati nei suddetti regolamenti CE.

Determinazione dell'acidità

Questa analisi serve per determinare il grado di idrolisi dell'olio misurando il contenuto di acidi grassi liberi presenti. Il metodo è descritto nell'allegato II del regolamento CE 2568/91.

Tabella 1 – Caratteristiche analitiche e limiti delle diverse categorie di olio di oliva.

	Olio di Oliva Extra Vergine	Olio di Oliva Vergine	Olio di Oliva Vergine Lampante	Olio di Oliva Raffinato	Olio di Oliva	Olio di Sansa di Oliva Greggio	Olio di Sansa di Oliva Raffinato	Olio di Sansa di Oliva
Acidità (%)	≤ 0,8	≤ 2,0	> 2,0	≤ 0,3	≤ 1,0	-	≤ 0,3	≤ 1,0
Perossidi (meqO ₂ /kg)	≤ 20	≤ 20	-	≤ 5	≤ 15	-	≤ 5	≤ 15
K ₂₃₂	≤ 2,50	≤ 2,60	-	-	-	-	-	-
K ₂₇₀	≤ 0,22	≤ 0,25	-	≤ 1,10	≤ 0,90	-	≤ 2,00	≤ 1,70
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	-	≤ 0,16	≤ 0,15	-	≤ 0,20	≤ 0,18
C _{14:0} Miristico (%)	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05
C _{18:3} Linolenico (%)	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0	≤ 1,0
C _{20:0} Arachico (%)	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6
C _{20:1} Eicosenoico (%)	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4
C _{22:0} Behenico (%)	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3
C _{24:0} Lignocerico (%)	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Σ isomeri <i>trans</i> -O (%)	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,40
Σ isomeri <i>trans</i> -(L+Ln) (%)	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,10	≤ 0,35	≤ 0,35
Acidi saturi sn-2 (%)	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,8	≤ 1,8	≤ 2,2	≤ 2,2	≤ 2,2
ECN ₄₂ (HPLC - teorico)	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,6	≤ 0,5	≤ 0,5
Alcoli alifatici (ppm)	≤ 300	≤ 300	≤ 400	≤ 350	≤ 350	-	-	-
Cere (ppm)	≤ 250	≤ 250	≤ 300	≤ 350	≤ 350	> 350	> 350	> 350
Stigmastadieni (ppm)	≤ 0,15	≤ 0,15	≤ 0,50	-	-	-	-	-
Eritroliolo + uvaolo (%)	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5
Colesterolo (%)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Brassicasterolo (%)	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Campesterolo (%)	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0
Stigmasterolo (%)	< camp.	< camp.	-	< camp.	< camp.	-	< camp.	< camp.
β-sitosterolo* (%)	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0
Δ7-stigmasterolo (%)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Steroli totali (ppm)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 2500	≥ 1800	≥ 1600
Mediana del difetto	0	≤ 2,5	< 2,5	-	-	-	-	-
Mediana del fruttato	> 0	> 0	-	-	-	-	-	-

* Somma di: Δ5,23-sigmastadienolo + clerosterolo + β-sitosterolo + sitostanolo + Δ5-avenasterolo + Δ5,24-stigmastadienolo

- Limite non definito dei regolamenti CE

Determinazione del numero di perossidi

L'analisi determina il grado di ossidazione primaria dell'olio misurando il contenuto di idroperossidi formati.

La metodologia è indicata nell'allegato III del regolamento CE 2568/91.

Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto

Valuta la qualità dell'olio sulla base dello slittamento della configurazione dei doppi legami isolati a dieni e trieni, determinando il grado di ossidazione primaria e secondaria dell'olio. Il metodo è descritto nell'allegato IX del regolamento CE 2568/91.

Determinazione degli acidi grassi

La composizione acidica, strettamente correlata con quella trigliceridica, risulta un modello utile nella rilevazione delle frodi, e dell'origine varietale e geografica degli oli (Damiani *et al.*, 1983; Lanza *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Stefanoudaki *et al.*, 1999). Il metodo è descritto negli allegati XA e XB del reg. CE 2568/91.

Determinazione degli acidi grassi *trans*

Lo scopo di queste analisi è quello di determinare l'aggiunta di oli raffinati o deodorati o idrogenati agli oli vergini di oliva, in quanto la configurazione degli acidi grassi insaturi è di norma *cis* e gli isomeri *trans* sono pressoché assenti negli oli ottenuti per spremitura. Il metodo è descritto negli allegati XA e XB del reg. CE 2568/91. Altre tecniche si possono comunque utilizzare per determinare gli acidi grassi *trans*: l'infrarosso (IR), la spettroscopia NMR, la GC capillare, l'HPLC e la cromatografia con fluidi supercritici (SFC).

Determinazione degli acidi grassi saturi in posizione sn-2 del trigliceride

Lo scopo di quest'analisi è quello di determinare l'aggiunta di oli esterificati agli oli vergini di oliva, in quanto la posizione sn-2 del trigliceride in natura è occupata principalmente dagli acidi grassi insaturi. Durante il processo di esterificazione, invece, si ha in posizione sn-2 una distribuzione random degli acidi grassi presenti, saturi ed insaturi. L'allegato VII del reg. CE 2568/91 descrive il metodo per determinare la composizione degli acidi grassi esterificati nella posizione sn-2 del glicerolo. Un altro metodo consiste della determinazione degli acidi grassi saturi in posizione sn-1,-3 e sn-2 dei trigliceridi negli oli usando la spettroscopia ^{13}C NMR.

Determinazione dei trigliceridi

Il profilo trigliceridico, insieme alla composizione acidica, può dare informazione relative alla genuinità e alla tipicità degli oli di oliva vergini, in quanto ognuno ha un profilo caratteristico ed unico (Stefanoudaki *et al.*, 1997). L'analisi dei trigliceridi permette inoltre di determinare e perfino identificare gli oli di semi usati per sofisticare l'olio di oliva, in quanto gli oli vegetali hanno una composizione trigliceridica molto diversa (Andrikopoulos *et al.*, 2001). Il metodo è descritto negli allegati VIII del regolamento CE 2568/91 e XVIII del regolamento CE 2472/97. Diverse tecniche si stanno mettendo a punto per determinare la composizione, la struttura e la distribuzione degli acidi grassi nelle posizioni sn-1, sn-2 e sn-3 dei trigliceridi; studi recenti stanno utilizzando l'analisi gas-cromatografica, la tecnica spettroscopica NMR e la spettrometria di massa al fine di agevolare e migliorare l'analisi dei trigliceridi (Parcerisa *et al.*, 2000; Santinelli *et al.*, 1992).

Determinazione degli alcoli

Determina l'aggiunta di olio di sansa di oliva alle altre categorie di oli di oliva, in quanto gli alcoli alifatici C_{22} - C_{28} sono trovati in grandi quantità negli oli vegetali e negli oli di estrazione con solvente. Il metodo è descritto nell'allegato IV del regolamento CE 2568/91.

Determinazione degli steroli e dei dialcoli triterpenici (eritrodiolo ed uvaolo)

La composizione sterolica è tipica per ogni olio, quindi è usata per determinare miscele fraudolente con altri oli vegetali o raffinati e per la caratterizzare gli oli vergini di oliva (Leardi e Paganuzzi, 1987). Quantità elevata di stigmasterolo indica la presenza di olio di soia, mentre l'aggiunta di oli raffinati fanno abbassare l'intensità del picco del β -sitosterolo e del Δ^5 -avenasterolo, ed aumenta quella del $\Delta^5,23$ -stigmastadiene. La determinazione dei dialcoli triterpenici ha lo scopo di identificare l'aggiunta di oli di oliva ottenuti con solventi da quelli per spremitura, in quanto eritrodiolo ed uvaolo sono localizzati sulla superficie esterna della buccia dell'oliva e l'estrazione con solventi ne aumenta il quantitativo nell'olio. Il metodo è descritto negli allegati V e VI del regolamento CE 2568/91.

Determinazione delle cere

Lo scopo di tale determinazione è quello di differenziare l'olio di oliva di pressione da quello ottenuto per estrazione con solvente, misurando il contenuto di esteri a lunga catena da C_{40} a C_{46} . Il metodo è descritto nell'allegato IV del regolamento CE 183/93.

Determinazione degli stigmastadieni

Lo scopo di tale determinazione è rivelare la presenza di oli vegetali e raffinati, ricchi di isomeri di stigmastadieni, nell'olio di oliva vergine, poveri di questi idrocarburi (inferiore a 0,15ppm). Gli stigmastadieni si formano per rimozione di una molecola di acqua dal β -sitosterolo, e questo accade facilmente durante il processo tecnologico della raffinazione. Il metodo è descritto nell'allegato XVII del regolamento CE 656/95.

Valutazione organolettica

L'odore, il gusto, le sensazioni tattili come untuosità e fluidità, e quelle chemestetiche come piccante ed astringente sono i principali parametri sensoriali nella valutazione della qualità organolettica dell'olio vergine di oliva (Angerosa, 1998; Bianchi, 1995). Il metodo è indicato nei reg. CE 2568/91 (allegato XII) e 1683/92.

Il **gusto** è la sensazione percepita dalle papille gustative per la presenza delle sostanze solubili acide, amare, salate e dolci. Nella valutazione organolettica dell'olio di oliva solo la sensazione di amaro, provocata dal glucoside oleuropeina dei polifenoli, è percepita come sapore.

La **sensazione tattile** può essere definita come la sensazione di secchezza, di raggrinzimento, di calore e di bruciore suscitata sulla lingua e nella cavità orale, come l'astringenza ed il piccante.

L'**aroma** è la somma delle sensazioni percepite quando diverse sostanze chimiche, trasportate dal vapore acqueo durante l'inalazione e l'inspirazione, reagiscono e stimolano i recettori olfattivi localizzati nella cavità nasale; i singoli composti non sono in grado di dare una percezione aromatica distinta, ma ognuno collabora con altre sostanze e contribuisce nella sensazione, come accade per i composti C_6 , aldeidi, alcoli ed esteri, che nell'insieme contribuiscono a dare la sensazione di "note verdi" all'aroma.

Il "**flavor**" è la sensazione complessa dovuta alla risposta combinata degli stimoli gustativi, olfattivi e tattili.

Le percezioni sensoriali sono presenti solo negli oli vergini ottenuti per sola estrazione meccanica, in quanto la raffinazione elimina la maggior parte dei composti volatili. Gli attributi positivi che definiscono la qualità di un olio vergine sono essenzialmente di quattro gruppi: il "fruttato di oliva", che ricorda essenzialmente la freschezza dell'oliva raccolta sana ed alla giusta maturazione; le "note verdi", sono legate all'odore dell'erba appena tagliate, delle foglie, dei frutti immaturi; altre "note di frutti e fiori", come mela, pomodoro, mandorle, carciofo, fiori selvatici, ecc; e la "sensazione di piccante, astringente ed amaro". Durante la conservazione queste sensazioni diminuiscono ed i sapori e gli odori si affievoliscono, attribuendo impropriamente all'olio la percezione di "dolce". Le sensazioni percepite come difetti sono molte e possono avere tre cause: cattiva coltivazione, raccolta e conservazione delle olive (agro – acido – avvinato – inacetito, grossolano, muffa – umidità, riscaldamento, saponoso, terra, vecchio e verme); cattiva tecnica di estrazione (acqua di vegetazione, cotto, fischio, lubrificante, metallico e sansa); cattiva conservazione degli oli (cetriolo, morchia e rancido).

La valutazione sensoriale degli oli vergini di oliva viene eseguita per: stabilire la qualità degli oli, verificando l'assenza o la presenza di difetti; dare un giudizio di conformità per gli oli DOP e IGP; ed infine rivelare caratteristiche sensoriali in relazione alla varietà, all'origine geografica, all'estrazione ed alla conservazione.

La valutazione della relazione tra composti chimici ed attributi sensoriali è l'aspetto più complesso dello studio della qualità (Angerosa *et al.*, 1996b, 1997 e 2000a; Aparicio *et al.*, 1995, 1996a e 1996b; Gutiérrez *et al.*, 1992b; Kiritsakis, 1998; Morales *et al.*, 1995). La ricerca di relazioni tra i metodi analitici e l'analisi sensoriale è resa difficile dal fatto che queste connessioni possono esistere tra una singola nota organolettica e la somma di sostanze chimiche, piuttosto che tra una singola nota ed un singolo composto. Uno degli obiettivi principali è cercare di ottenere più informazioni sui composti che influenzano l'analisi sensoriale e sviluppare un modello matematico che correla i valori delle analisi chimiche con quelli ottenuti

dal panel test. Le possibili relazioni tra i composti chimici e gli attributi sensoriali (tabella 2) sono state studiate per anni applicando diverse procedure statistiche multivariate come, la rete neurale artificiale (ANN), l'analisi dei componenti principali (PCA), l'analisi descrittiva quantitativa (QDA), e la ruota sensoriale statistica (SSW).

Tabella 2 – Relazioni tra gli attributi sensoriali ed i composti chimici dell'olio identificate da diversi autori.

Attributi sensoriali	Composti chimici
<i>Note verdi</i>	2-metilpropan-1-olo; <i>cis</i> -2-penten-1-olo; 2-esen-1-olo; 3-esen-1-olo <i>trans</i> -2-pentenale; esanale; 2-esenale; 3-esenale; 2-ottenale; aldeidi C ₆ sature ed insature pentan-3-one; 4-metilpentan-2-one; nonan-2-one; chetone C ₈ metil acetato; butil acetato; esil acetato; 3-esenil acetato; etil propionato; metil decanoato 1-ottene etilfurano
<i>Fruttato</i>	pentan-1-olo; alcoli C ₅ e C ₆ saturi ed insaturi 3-metilbutanale; aldeidi C ₅ e C ₆ sature ed insature butan-2-one 3-metilbutil acetato; 3-esenil acetato; etil metilbutirrato; etil cicloesanoato; esteri degli alcoli ed aldeidi C ₅ e C ₆ saturi ed insaturi etilbenzene
<i>Frutto maturo</i>	pentan-1-olo; 4-metil-1-penten-3-olo 3-metilbutanale; 2-metil-2-butenale; <i>cis</i> -2-pentenale; <i>trans</i> -3-esenale; 2,4-esadienale eptan-2-one metilbenzene
<i>Olive mature</i>	ottan-2-one 3,4-dimetil-3-pentenilfurano
<i>Mela</i>	esanale; 3-esenale butan-2-one; nonan-2-one 2-metilbutil propionato
<i>Ribes</i>	4-metossi-2-metilbutantiolo
<i>Dolce</i>	3-metilbutanale; esanale pentan-3-one; 1-penten-3-one; nonan-2-one etil acetato; butil acetato; etil propionato etilfurano
<i>Amaro</i>	2-metil-3-buten-1-olo; <i>trans</i> -3-esen-1-olo 2-metil-4-pentenale; 2-esenale 6-metil-5-epten-2-one 3-metilbutil acetato; 2-metilbutil propionato; metil decanoato tridecene; dodecene; etilbenzene; idrocarburo C ₁₁ fenoli semplici (tiroso ed acidi fenolici)
<i>Piccante</i>	2-metil-4-pentenale polifenoli
<i>Indesiderabili</i>	2-metilbutan-1-olo; 3-metilbutan-1-olo; 2-metil-3-buten-1-olo; 1-penten-3-olo; esan-1-olo; <i>trans</i> -2-esen-1-olo 2-metil-2-butenale etil acetato; 3-metil-2-butenil acetato acido acetico dodecene; 1,2,4-trimetilbenzene
<i>Fritto - Grasso</i> <i>Inacidimento</i>	2-esenale; 2-nonenale; 2,4-decadienale acidi grassi liberi
<i>Ossidazione</i>	formaldeide; acetaldeide; propanale; butanale; 2-butenale; pentanale; 2-pentenale; esanale; 2-eptenale; 2-ottenale; 2,4-decadienale; 2,6-decadienale; undecanale; 2-undecanale
<i>Riscaldamento</i>	2-metilbutan-1-olo; 3-metilbutan-1-olo 2-metilbutanale; 3-metilbutanale
<i>Avvinato</i>	alcol etilico acido acetico etil acetato
<i>Muffa</i>	ottan-1-olo; ottan-3-olo; 1-otten-3-olo ottan-3-one
<i>Rancido</i>	esan-1-olo <i>trans</i> -2-pentenale; esanale; <i>trans</i> -2-eptenale
<i>Untuosità</i>	gliceridi saturi
<i>Scorrevolezza</i>	gliceridi insaturi
<i>Ferro</i>	metalli ossido-riducenti

1.3.3.2 – METODICHE ANALITICHE COMPLEMENTARI

Per determinare in modo più preciso e dettagliato il concetto di qualità, soprattutto ai fini di una caratterizzazione chemiometrica varietale o di studiare la conservazione, insieme alle metodiche previste dai regolamenti CE sono state messe a punto, e molte sono ancora in via di sviluppo, altre procedure analitiche.

Determinazione degli alcani (idrocarburi)

I n-alcane C_{27} , C_{29} e C_{31} sono predominanti negli oli vegetali, mentre nell'olio di oliva predominano il C_{23} , C_{25} e C_{27} . La frazione idrocarburica degli oli (>1000ppm) è costituita da una serie di composti che possono servire per indicare alcune caratteristiche nutrizionali e per tipicizzare il prodotto (Guinda *et al.*, 1996). Alcuni idrocarburi non sono naturali e si formano durante la raffinazione per alterazione degli steroli, come accade, per esempio, allo stigma-3,5-diene che si forma dalla deidratazione del β -sitosterolo.

Determinazione dei composti volatili dello spazio di testa

L'aroma dell'olio vergine di oliva è dato dai composti volatili dello spazio di testa, i quali possono essere considerati un'impronta digitale dell'olio, ma possono improvvisamente cambiare quando il campione è deteriorato con l'ossidazione. Il contenuto totale in composti volatili aumentava con il progressivo deterioramento dell'olio, ed il nonanale (prodotto dell'ossidazione) e l'esnale (prodotto della lipossigenasi), variano in quantità durante l'ossidazione dell'olio; inizialmente (olio fresco) l'esnale è alto mentre il nonanale è in tracce, successivamente i composti sono presenti in quantità simili (olio ossidato). Sebbene la composizione qualitativa dei composti volatili sia simile negli oli vergini di oliva, le quantità possono variare in misura tale da consentire di caratterizzare l'olio in relazione alla varietà, ai fattori agronomici, alla maturazione, all'origine geografica, al sistema di estrazione ed alla conservazione (Solinas *et al.*, 1987).

Molti tentativi sono in atto per identificare quali siano i composti volatili responsabili delle note sensoriali (attributi positivi e difetti), cercando di mettere a punto dei metodi oggettivi ed eliminando gli svantaggi dell'analisi sensoriale del panel test, fondamentalmente soggettiva. Una tecnica attualmente usata è la GC-MS per identificare i composti volatili (Angerosa *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1994, 1997 e 1998; Reinert and Grosch, 1998; Tateo *et al.*, 1994). Aparicio *et al.* (1996a) e Kiritsakis (1998) proposero l'analisi dei composti volatili attraverso GC-sniffing, in modo da associare le molecole chimiche alle note sensoriali principali (tabella 3); altre linee di ricerca (Sacchi *et al.*, 1996; Segre and Mannina, 1997), invece, sono orientate verso la NMR a 600MHz, in cui gli spettri mostrano numerosi segnali strutturali e compositivi in relazione alla composizione ed alla qualità dell'olio, con la possibilità di determinare i composti minori senza l'estrazione o la derivatizzazione chimica della matrice oleosa.

Per decidere il metodo di analisi da adottare per determinare i composti volatili occorre tener presente che: la concentrazione dei composti volatili è normalmente bassa; le sostanze volatili comprendono composti di peso molecolare e natura chimica diversa; la frazione aromatica estratta potrebbe non essere rappresentativa del campione in quanto i composti hanno proprietà fisiche diverse (solubilità, temperatura ebollizione, ecc.); la concentrazione richiede l'uso di solventi; sostanze estranee presenti nell'ambiente (fumo, profumi, ecc.) potrebbero interferire nei risultati.

Le analisi solitamente consistono nella separazione dei composti volatili dal campione, nella concentrazione, nel frazionamento e nell'identificazione. I metodi attualmente conosciuti ed usati possono essere suddivisi in 2 gruppi: quelli che non richiedono la concentrazione (iniezione diretta e spazio di testa statico) e quelli che necessitano della concentrazione (distillazione, distillazione ed estrazione simultanea, spazio di testa dinamico ed estrazione con fluidi supercritici).

Tabella 3 – Composti volatili identificati da diversi autori correlati all'analisi GC-sniffing e sensoriale.

COMPOSTI VOLATILI	GC-SNIFFING	PANEL TEST	COMPOSTI VOLATILI	GC-SNIFFING	PANEL TEST
Alcoli			Derivati tiofenici e furanici		
etanolo		avvinato	3-isopropeniltiofene		
2-metilpropan-1-olo	etil acetato	note verdi	2,5-dietiltiofene		
2-metilbutan-1-olo	olio di pesce	indesiderabile, riscaldamento	2-etil-5-esiltiofene		
3-metilbutan-1-olo		indesiderabile, riscaldamento	etilfurano	dolce	dolce, note verdi
2-metil-3-buten-1-olo		indesiderabile, amaro	2-propilfurano		
pentan-1-olo	piccante	fruttato, frutto maturo	3-metilfurano		
pentan-3-olo			3-metil-2-pentilfurano		
1-penten-3-olo	terra umida	indesiderabile	2-propilididrofurano		
cis-2-penten-1-olo	banana	note verdi	3,4-dimetil-3-pentenilfurano	vernice	olive mature
4-metil-1-penten-3-olo	banana	frutto maturo			
esan-1-olo	fruttato, aroma debole	indesiderabile, rancido	Esteri		
cis-2-esen-1-olo	frutto verde	note verdi	metil acetato		note verdi
trans-2-esen-1-olo	note verdi	indesiderabile, n.verdi	etil acetato	dolce, aromatico	indesiderabile, dolce
cis-3-esen-1-olo	banana	note verdi	2-metil-1-propil acetato		
trans-3-esen-1-olo		amaro, note verdi	butil acetato	pungente, note verdi	dolce, note verdi
4-esen-1-olo			2-metilbutil acetato		
eptan-1-olo			3-metilbutil acetato	banana	amaro, fruttato
ottan-1-olo		muffa	3-metil-2-butenil acetato	stucco	indesiderabile
ottan-3-olo		muffa	isopentil acetato		
1-otten-3-olo		muffa	esil acetato	dolce, fruttato	note verdi
2-otten-1-olo			2-esenil acetato		
nonan-1-olo			cis-3-esenil acetato	banana, note verdi	note verdi, fruttato
1-decanolo			trans-3-esenil acetato	banana, note verdi	note verdi, fruttato
lavandulolo			ottil acetato		
linalolo			2-etilfenil acetato		
alcol benzilico			benzil acetato		
2-feniletan-1-olo			fenetil acetato		
α-terpineolo			etil propionato	dolce, mela, fragola	dolce, note verdi
1,8-cineolo			propil propionato		
anisolo			etil 2-metilpropionato		
			propil 2-metilpropionato		
Aldeidi			2-metilbutil propionato	aromatico, chetone	amaro, oliva, mela
formaldeide (metanale)		ossidato	metil butirrato		
acetaldeide (etanale)		ossidato	etil butirrato		
n-propanale		ossidato	metil 2-metilbutanoato		
n-butanale		ossidato	etil 2-metilbutirrato		fruttato
2-butenale		ossidato	metil 3-metilbutirrato		fruttato
2-metilbutanale		riscaldamento	etil 3-metilbutirrato		
3-metilbutanale	dolce, fruttato	fruttato, dolce, riscaldamento	butil 3-metilbutanoato		
2-metil-2-butenale	solvente	indesiderabile, f. maturo	metil n-pentanoato		
n-pentanale		ossidato	metil n-esanoato		
cis-2-pentanale	note verdi, piacevole	frutto maturo, ossidato	etil esanoato		
trans-2-pentanale	note verdi, mela	note verdi, ossidato	etil cicloesanoato		fruttato
2-metil-4-pentanale	foglie secche	amaro, piccante,	metil n-eptanoato		
n-esanale	note verdi, mela	dolce, n.verdi, ossidato	metil n-ottanoato		
cis-2-esenale	fruttato, mandorle	note verdi, amaro	etil n-ottanoato		
trans-2-esenale	note verdi, mandorle	amaro, note verdi	etil n-nonanoato		
cis-3-esenale	note verdi	note verdi, mela	metil n-decanoato	fresco	note verdi, amaro
trans-3-esenale	n.verdi, fiori, carciofo	f. maturo, n.verdi, mela	etil benzoato		
2,4-esadienale		frutto maturo	metil salicilato		
n-eptanale			metil palmitato		
cis-2-eptenale		ossidato	etil palmitato		
trans-2-eptenale		ossidato, rancido	etil oleato		
2,4-eptadienale			metil linoleato		
n-ottanale			etil linoleato		
trans-2-ottanale		note verdi, ossidato	Eteri		
n-nonanale			dietil etere		
cis-2-nonenale		grasso, fritto	metossibenzene		
trans-2-nonenale		grasso, fritto	1,2-dimetossibenzene		
2,4-nonadienale					
trans-2-decenale			Idrocarburi		
2,4-decadienale		ossidato	2-metilbutano		
2,6-decadienale		ossidato	2-metilpentano		
undecanale		ossidato	3-metilpentano		
trans-2-undecenale		ossidato	n-esano		
benzaldeide			esene		
Chetoni			n-eptano		
acetone			n-ottano		
butan-2-one	piacevole, fragrante	fruttato, mela	1-ottene	solvente	note verdi
3-metilbutan-2-one			nonano		
n-pentan-3-one	dolce	note verdi, dolce	dodecene		indesiderabile, amaro
4-metilpentan-2-one	dolce	note verdi	tridecene		amaro
1-penten-3-one	dolce, fragola	dolce	dimeri pentenici		
n-esan-2-one			metilbenzene	colla, solvente	frutto maturo
n-eptan-2-one	fruttato	frutto maturo	etilbenzene	forte	amaro, fruttato
2-metil-2-epten-6-one			1,2,4-trimetilbenzene	olio di pesce	indesiderabile
6-metil-5-epten-2-one	fruttato	amaro	stirene		
n-ottan-2-one	muffa	olive mature	naftalene		
n-ottan-3-one		muffa	etilnaftalene		
n-nonan-2-one	fruttato	dolce, note verdi, mela	dimetilnaftalene		
acetofenone			acenaftene		
			achilbenzeni		

Determinazione dei composti fenolici

Le metodiche messe a punto per identificare i polifenoli nell'olio hanno permesso di evidenziare il ruolo che ciascuna cultivar gioca sulla dotazione finale di polifenoli nell'olio, e di comprendere che questi composti, durante la maturazione del frutto, la lavorazione e la conservazione, si riducono nei valori totali subendo un'evoluzione continua. La valutazione quali-quantitativa dei polifenoli, inoltre, può essere utile per una tipizzazione del prodotto, per caratterizzarne la provenienza e come marker qualitativo di conservazione.

I polifenoli devono essere estratti dall'olio (preparazione) e poi possono essere dosati colorimetricamente con uno spettrofotometro (per determinarne il contenuto totale), oppure separati cromatograficamente con una TLC, HPLC o GC, ed identificati con detector DAD, NMR o MS (per delinearne e quantificarne il profilo caratteristico). Numerosi sono i lavori riguardanti le metodiche per l'estrazione e la caratterizzazione dei polifenoli: Angerosa *et al.*, 1995 e 1996c; Antolovich *et al.*, 2000; Caponio *et al.*, 1999; Cortesi *et al.*, 1981, 1995a e 1995b; Le Floch *et al.*, 1998; Montedoro *et al.*, 1992a, 1992b e 1993b; Pirisi *et al.*, 2000; Romani *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 1999b, 1999c e 1999d; Tasioula-Margari and Okogeri, 2001; Vacca *et al.*, 1993).

Determinazione dei tocoferoli

L'analisi consiste nella separazione per HPLC e l'identificazione mediante detector a fluorescenza o spettrofotometro UV-visibile. Essi, in sinergia con i polifenoli, sono antiossidanti e danno stabilità all'olio indicandone la conservabilità (Manzi *et al.*, 1998; Psomiadou and Tsimidou, 1998; Zalejska-Fiolka, 2000).

Determinazione del colore e dei pigmenti: clorofille e carotenoidi

La colorazione dell'olio avviene mediante il meccanismo in cui i pigmenti assorbono la luce e la riflettono.

Il colore dell'olio vergine di oliva varia dal giallo paglierino al verde scuro molto intenso a seconda dei pigmenti liposolubili in esso contenuti: le clorofille danno una colorazione giallo-verde, mentre i carotenoidi impartiscono una gradazione giallo-rossa. Negli oli che hanno subito la raffinazione il contenuto di pigmenti diminuisce, in particolare durante la fase di decolorazione. La determinazione dei pigmenti (clorofille e carotenoidi) è condotta per HPLC o per spettrofotometria visibile (Canjura and Schwartz, 1991; Minguéz-Mosquera *et al.*, 1992; Rahmani and Saari Csallany, 1991; Serani e Piacenti, 2001; Ward *et al.*, 1994).

Determinazione dello stato di ossidazione

L'ossidazione dei lipidi porta alla formazione degli idroperossidi, i quali sono prodotti primari molto instabili e, per decomposizione, formano i prodotti secondari stabili, che provocano un flavor sgradevole. L'importanza maggiore nel controllo della qualità è la determinazione dell'entità dell'ossidazione. I metodi analitici sviluppati (Aluigi *et al.*, 1999; Aparicio *et al.*, 1999; Bacchiocca *et al.*, 2001; Ninfali *et al.*, 2001; Monografia *Metrohm Italiana*; Pizzale *et al.*, 1999) sono basati sui prodotti formati e/o coinvolti nel processo degradativo e possono essere divisi in 2 gruppi: i metodi statici misurano il consumo di reagenti, la formazione di prodotti primari e quelli secondari dovuti alla decomposizione degli idroperossidi, quindi si basano sulla misura dello stato di ossidazione dell'olio; mentre i metodi dinamici sono test di resistenza alla stabilità ossidativa, questi metodi forzano l'ossidazione e ne seguono l'andamento, mostrano una fase iniziale lenta in cui l'olio non sembra cambiare (periodo d'induzione) e poi segue una rapida fase di diffusione terminando con la decomposizione dell'olio e la produzione di prodotti volatili negativi. Le determinazioni ci offrono la possibilità di valutare il grado di ossidazione dell'olio, di definire come cambia la qualità durante la conservazione, ed infine di predire la vita media d'olio in diverse condizioni di conservazione (Pagliarini *et al.*, 2000).

1.3.3.3 – TECNICHE INNOVATIVE

L'analisi degli oli vegetali è soggetta a intensa attività di ricerca al fine di determinare nuove tecnologie e metodologie analitiche rapide, accurate ed automatiche atte a controllare la qualità. La necessità di ridurre il tempo dell'analisi ed i costi, l'aumento della domanda di analisi in-linea, e i limiti delle tecniche tradizionali hanno acceso l'interesse per le tecniche spettroscopiche. Uno dei vantaggi di queste tecniche è che il campione può essere analizzato nella sua forma gassosa, o liquida o solida. In cromatografia ogni picco è caratteristico di un preciso composto, mentre in spettroscopia le bande sono il risultato della vibrazione di uno o più legami chimici (per esempio: C-H, C=C, ecc.) presenti in tutti i composti del campione, quindi ogni banda dello spettro di una miscela contiene la somma delle informazioni di varie molecole. Queste tecniche sono utilizzate per la determinazione del grado di insaturazione, dei contenuti di *trans* e *cis* isomeri, della quantità di acidi grassi liberi, di saponificabile, e per monitorare il processo di ossidazione. Lo sviluppo di moderne tecniche analitiche di spettroscopia e di spettrometria, usate con le tecniche cromatografiche tradizionali, hanno permesso di ottenere maggiori informazioni sui composti. Esempi di tecniche accoppiate sono: GC-MS, LC-MS, Pirolisi-MS e LC-NMR.

Spettroscopia nell'infrarosso (NIR - MIR – FIR)

La spettroscopia nell'infrarosso è una tecnica nella quale l'interazione delle radiazioni elettromagnetiche con un campione viene utilizzata sia per ottenere informazioni chimiche qualitative sia quantitative. La regione infrarosso si trova tra la fine del rosso dello spettro del visibile e la regione delle microne, quindi la lunghezza d'onda è tra gli 800 nm e i 250 μm . Questa regione è suddivisa in vicino (NIR), medio (MIR) e lontano infrarosso (FIR). Con la tecnica NIR è possibile avere informazioni a riguardo del grado e numero di insaturazioni dei doppi legami e del numero di atomi di carbonio, quindi definisce gli acidi grassi ed i trigliceridi ed è stata usata come misura per l'adulterazione dell'olio di oliva (Wesley *et al.*, 1995). La spettroscopia MIR è usata per determinare il contenuto di *cis* e *trans* isomeri degli acidi grassi ed ottenere informazioni a riguardo di altri composti con diversi gruppi funzionali (-CH₂, -CH₃, -C=O, -COOH, ecc.). Recentemente è stata riconosciuta come una delle tecniche più potenti per determinare i diversi costituenti negli oli edibili e per l'identificazione degli oli vergini di oliva adulterati con oli di semi.

Spettroscopia Raman

Questa tecnica coinvolge simultaneamente le radiazioni assorbite e quelle emesse. Quando il campo elettrico interagisce con la molecola, essa esercita la stessa forza in tutti gli elettroni nella molecola e tende a spostarli dalla loro posizione originale intorno al nucleo carico positivamente. Gli spostamenti risultano un momento di dipolo indotto nella molecola che è proporzionale al campo elettrico. Gli spettri mostrano i picchi di caratteristici gruppi (=C-H, -CH₂, -CH₃, C=O, C=C *trans* e *cis*, -(CH₂)_n-, ecc.), quindi sono rappresentativi della composizione acidica (*cis* e *trans* isomeri, quantità insaturazioni e C_n) e dei composti secondari.

Risonanza magnetica nucleare

Le NMR ¹H e ¹³C sono state recentemente dimostrate essere importanti sia da sole che combinate ad altre tecniche, per l'analisi delle olive e dell'olio di oliva. La risonanza magnetica nucleare all'idrogeno (¹H NMR) è usata per analizzare i componenti minoritari dell'olio (Emanuele *et al.*, 1998), in quanto i gruppi funzionali caratteristici corrispondono a bande specifiche degli spettri, quindi si possono determinare lo squalene, gli

idrocarburi, gli steroli, gli alcoli triterpenici, ecc. La NMR ^1H ad alto campo è stata usata, inoltre, nella caratterizzazione varietale e nell'origine geografica degli oli vergini di oliva (Mannina *et al.*, 2001). La risonanza magnetica nucleare del carbonio (^{13}C NMR) è usata per analizzare la componente maggioritaria dell'olio, per determinare la proporzione tra gruppi acilici saturi, monoinsaturi e polinsaturi, e la distribuzione sn-1, -2 e -3 degli acidi grassi sul glicerolo, in quanto gli spettri mostrano picchi caratteristici che corrispondono a strutture molecolari particolari, definendo la composizione acidica e trigliceridica (Sacchi *et al.*, 1990; Vlahov *et al.*, 1996 e 1999). La NMR ^{13}C offre il vantaggio di avere un intervallo di spostamento chimico (chemical shift) più ampio rispetto alla NMR ^1H , in quanto lo spostamento chimico dipende dall'ibridazione del carbonio (sp^3 , sp^2 , e sp^1) e dal suo intorno chimico strutturale. Queste caratteristiche permettono, applicando metodi chemiometrici sui dati, di discriminare gli oli in base all'origine geografica e varietale, e di determinare possibili frodi.

Pirolisi – spettrometria di massa (Py-MS)

La pirolisi è un processo fisico che degrada termicamente un campione organico a temperature note in un'atmosfera inerte o nel vuoto. Essa causa la rottura delle molecole nei legami più deboli per produrre frammenti volatili più piccoli. Successivamente questi frammenti passano nello spettrometro di massa, il quale li bombarda con elettroni così da generare degli ioni (frammenti con una carica). Gli ioni vengono separati sulla base della loro massa e carica e formano un spettro che può essere usato come un profilo chimico o un'impronta del campione analizzato. I vantaggi della Py-MS sono la riproducibilità, il basso costo e la brevità dell'analisi. I dati ottenuti, elaborati statisticamente, possono essere usati per i controlli delle frodi in campo alimentare, e nel caso specifico dell'olio vergine di oliva per determinare le adulterazioni con oli raffinati o di diversa natura, presenti in quantità almeno del 2%. Gli oli vergini di oliva sono caratterizzati da una grande variabilità nella loro composizione, data principalmente dalla varietà genetica dei frutti e dalle condizioni ambientali, dalla raccolta e stoccaggio dei frutti, dal processo di lavorazione e dalla conservazione dell'olio. Sfruttando questa variabilità ed usando la Py-MS si stanno mettendo a punto metodi precisi per la certificazione dell'origine geografica e varietale degli oli (Salter *et al.*, 1997; AAVV, 1998).

Spettrometria di massa (MS) e tecniche cromatografiche accoppiate (GC-MS, LC-MS, LC-GC)

La spettrofotometria di massa (**MS**) è una tecnica fisica utilizzata per caratterizzare le molecole organiche e per determinarne i pesi molecolari. La MS fornisce anche informazioni sulle unità strutturali che compongono la molecola, e gli spettri di massa rivelano, inoltre, la presenza degli isotopi degli elementi (De Hoffmann *et al.*, 1996; Tateo *et al.*, 1997). Questa tecnica è usata per caratterizzare ed individuare molti composti presenti nell'olio vergine di oliva (Bortolomeazzi *et al.*, 1999).

La **GC-MS** è stata usata con successo nelle analisi dell'olio di oliva per trovare la struttura chimica di diverse classi di composti. Questi composti devono essere separati prima della loro iniezione in GC usando diverse tecniche cromatografiche: TLC, SPE, ecc. La GC-MS è stata usata per identificare molte sostanze nell'olio, come gli steroli, le cere, i composti polifenolici, ecc., usando tecniche ad impatto elettronico (EI) ed ad ionizzazione chimica (CI).

L'utilizzo del metodo **LC-MS** si sta sviluppando solo in questi ultimi anni per l'analisi dei costituenti dell'olio. Attualmente si stanno mettendo a punto metodologie analitiche per lo studio dell'ossidazione dei polifenoli.

La tecnica accoppiata **LC-GC** sfrutta la tecnologia sofisticata dell'HPLC per la preparazione del campione e la maggior efficienza di separazione della GC. L'identificazione dei composti potrebbe essere fatta con lo

spettrometro UV sull'eluato della LC e poi con il FID o MS dopo la separazione GC. Questi metodi automatici offrono i vantaggi di analizzare diversi campioni al giorno e danno informazioni a riguardo della struttura originale delle sostanze analizzate, la quale si potrebbe perdere attraverso la trasformazione chimica. Con il metodo LC-GC automatico è possibile determinare differenze nei vari oli, le quali sono fondamentali per definire i parametri di qualità e per verificare le frodi. La tecnica LC-GC è stata usata per le analisi della frazione insaponificabile dell'olio di oliva: steroli, alcoli, ecc. La LC rimuove la maggior parte dei trigliceridi e separa gli alcani, le cere ed i prodotti deidrogenati, che sono poi trasferiti direttamente al GC.

Naso elettronico

Nell'industria alimentare sta crescendo l'esigenza di sistemi automatici di controllo della qualità che non richiedano l'impiego di metodiche analitiche complesse o panel test organolettici. Il naso elettronico rappresenta una nuova strumentazione chimica per l'analisi degli aromi, ed il principio di funzionamento si differenzia nettamente dalle tecniche principalmente usate. Il naso elettronico è composto da: un sistema di campionamento dei composti volatili (spazio di testa), celle contenenti i sensori ed un sistema per la raccolta (computer) ed il trattamento dei dati (analisi statistiche multivariate e/o reti neurali). La capacità del naso elettronico di distinguere i campioni tra loro e di riconoscere campioni incogniti verrà studiata in funzione dei seguenti parametri: sistema di campionamento, quantità e temperatura del campione per singola analisi, tempi e modalità del campionamento; scelta e selezione dei sensori da impiegare sulla base dei parametri di stabilità e selettività; dimensione della banca dati da creare in funzione del grado di differenziazione richiesto; scelta del tipo di analisi statistica per l'elaborazione dei dati ed il riconoscimento di campioni incogniti. Esistono 2 diverse tecnologie di funzionamento chiamate "e-nose" e "z-nose".

La tecnica "**e-nose**" analizza la frazione volatile, responsabile in gran parte della percezione dell'odore, separando ed identificando i vari componenti, e dà una valutazione complessiva, mimando in questo il comportamento umano. Tale risultato viene ottenuto utilizzando un insieme di sensori ognuno dei quali risponde in maniera diversa alla miscela complessiva delle molecole che compongono un aroma. Le differenti risposte dei vari sensori vengono processate con metodi statistici o reti neurali per dare la valutazione complessiva (Guadarrama *et al.*, 2001; Oliveros *et al.*, 2002).

La tecnica "**z-nose**" provvede ad organizzare un'immagine virtuale nello spazio di N-dimensioni (dove N equivale al numero dei sensori) di specifici vapori (fragranze, aromi) nelle miscele di composti volatili nello spazio di testa. L'analisi chimica è compiuta in pochi secondi mediante una separazione cromatografica molto veloce dei composti volatili dello spazio di testa del campione. La tecnica usata si basa su una separazione gas-cromatografica veloce (FGC) dei composti, i quali vengono quantificati successivamente dal rivelatore in proporzione alla frequenza dell'onda acustica superficiale (SAW) trasmessa dal detector. Un'elaborazione computerizzata dell'analisi dà una rappresentazione quali e quantitativa del campione in esame attraverso un'immagine che tiene conto del tempo di ritenzione dei composti usciti dal GC (angolo radiale) e dell'intensità di frequenza di odore del detector (distanza dal centro). La sensibilità può arrivare fino al ppb per i composti volatili ed al ppt per i composti semi-volatili (Staples, 2000).

Il naso elettronico è un nuovo approccio di analisi studiato per sostituire l'analisi sensoriale (Pardo *et al.*, 2001; Stella *et al.*, 2000), per distinguere gli oli vegetali (Martin *et al.*, 1999), per controllare l'aroma dell'olio vergine di oliva (Guadarrama *et al.*, 2000), e per caratterizzare il suo profilo sensoriale (AAVV, 1998).

1.3.3.4 – METODI STATISTICI

Le tecniche statistiche ed i modelli di classificazione a queste legate possono costituire strumenti di grande interesse nell'approntare le problematiche che sorgono ai fini dell'individuazione dell'origine geografica e della qualità del prodotto, oltre che della tassonomia di cultivar o di cloni. Considerando un insieme di campioni (osservazioni), provenienti da 2 o più zone di produzione qualitative (variabili di classificazione), e su cui sono state fatte una serie di analisi chimiche quantitative (variabili di analisi), l'insieme di questi parametri è detto "collettivo statistico". Si parla di "analisi multivariata" ogni volta che si considera più di una variabile alla volta (Camussi et al., 1995; Wonnacott e Wonnacott, 1998).

Numerose ricerche (Del Signore, 1999; Drava *et al.*, 1994; Storelli e Gambacorta, 1998) sono state svolte al fine di trovare un modello chemiometrico idoneo a definire la qualità globale dell'olio vergine.

Analisi della varianza (ANOVA)

L'analisi della varianza ha sempre avuto ampie applicazioni in quanto consente di ottenere una valutazione quantitativa dell'importanza delle diverse *fonti di variazione* (di tipo sistematico o di tipo casuale) nella variabilità osservata nel corso di un esperimento.

Analisi delle componenti principali (PCA)

La PCA consente di esplorare le relazioni tra variabili, rende agevole la descrizione e rappresentazione di fenomeni multidimensionali e permette di isolare l'informazione utile dal "rumore", all'interno di un gruppo di variabili, tra le quali non viene fatta alcuna suddivisione fra dipendenti ed indipendenti. Scopo della PCA è ottenere un piccolo gruppo di combinazioni (componenti principali) da un insieme di variabili quantitative di partenza, senza apprezzabile perdita di informazione utile, ma anzi con riduzione del "rumore di fondo", ed identificazione degli "outliers". Sulle componenti principali è possibile operare analisi dei cluster, determinare modelli di regressione e di classificazione, trovare relazioni e collegamenti fra le variabili originali, ecc. Le componenti principali hanno la caratteristica di descrivere in maniera ottimale la variabilità del collettivo in osservazione. Questa metodica è stata applicata da Forina *et al.* (1983) sulla composizione dell'olio.

Analisi di raggruppamento (clusters analysis)

Questo metodo statistico ha come scopo di stabilire se è possibile riconoscere dei raggruppamenti in un certo insieme di osservazioni, di individuare tali raggruppamenti e descriverli statisticamente. Questo metodo è stato applicato da Řezanka and Řezanková (1999) per distinguere l'adulterazione dell'olio di oliva da quelli di semi, usando i dati della composizione acidica e trigliceridica.

Analisi discriminante

Questa analisi tratta insiemi di osservazioni in cui sono noti dei gruppi qualitativi di "variabili di classificazione" definiti da uno o più fattori quantitativi di "variabili di analisi". L'analisi è orientata a diversi fini:

- Produrre modelli di classificazione, cioè sviluppare una regola matematica basata sulle variabili quantitative prese in considerazione, permettendo di attribuire un'osservazione ad una delle classi con la minima possibilità di errore. Fornisce gli strumenti per classificare le osservazioni di appartenenza incognita o dubbia, in base a quanto appreso da osservazioni di appartenenza certa, rende possibile la costruzione di modelli di classificazione operativi. I metodi possono essere parametrici o non e le funzioni

discriminanti sono lineari (LDA) o quadratiche (QDA). Bianchi *et al.* (1993) hanno usato l'LDA di 6 acidi grassi per attribuire la relativa origine di oli italiani e d'importazione.

- Produrre variabili canoniche (CDA), cioè determinare le combinazioni lineari delle variabili quantitative considerate che meglio sintetizzano la variabilità tra le classi; selezionare un insieme di poche variabili canoniche che possono vantaggiosamente sostituire, ai fini della classificazione dei dati, le molte variabili di partenza; e fornire un ausilio alla comprensione e rappresentazione anche grafica del fenomeno considerato. Queste variabili hanno la caratteristica di essere tra loro incorrelate e, come le componenti principali, sono combinazioni lineari delle variabili originali.
- Ridurre la dimensionalità dei modelli, allo scopo di rendere più agevole la comprensione e la rappresentazione. Tra queste analisi discriminanti si inseriscono quella “passo-passo” (step-wise) e quella che utilizzano alcuni risultati della PCA e della CDA. La prima ha lo scopo di determinare le variabili più importanti per una corretta classificazione delle osservazioni e di eliminare dal modello le variabili che risultano poco utili a questo fine, operativamente consiste nell'eliminazione e/o nell'immissione progressiva (passo-passo) di una variabile alla volta nel modello, per mezzo di diversi possibili criteri di valutazione. La seconda utilizza i risultati della PCA e della CDA e sceglie un sottoinsieme di componenti principali (PC) o di variabili canoniche (CV) che ritiene adeguate a descrivere in maniera soddisfacente il collettivo considerato, successivamente vengono immesse nel modello la variabili di partenza legate alle componenti principali e alle variabili canoniche selezionate, o si può costruire il modello su queste ultime.

La valutazione dell'efficacia discriminatoria consiste nel classificare ogni osservazione in base al criterio discriminante tratto dalle altre osservazioni e richiede, quindi, che tale funzione sia ricalcolata tante volte quante sono le osservazioni stesse, evitando l'insorgere di errori di attribuzione artificialmente bassi che non costituiscono una buona stima del reale potere discriminatorio del modello, lasciando fuori dal modello una o più osservazioni del collettivo considerato. Il metodo della crossvalidazione è applicato anche nel calcolo delle componenti principali e dei modelli di regressione. Si tratta cioè di dare pesi diversi ad errori diversi, o di privilegiare modelli orientati a non commettere un certo tipo di errore, eventualmente a scapito della precisione su altre attribuzioni, ritenute meno gravi se erranee.

Reti Neurali Artificiali (ANN)

Le reti neurali artificiali sono gli unici metodi statistici che simulano l'architettura del cervello umano. La procedura di apprendimento della rete neurale avviene esaminando ripetutamente i dati di ingresso e fornendo una soluzione che viene confrontata con quella propria dell'evento e di volta in volta migliorata fino a raggiungere un livello accettabile di errore (apprendimento supervisionato), oppure producendo una soluzione che sia consistente con i dati in entrata (apprendimento non supervisionato). Una volta terminato l'apprendimento, la rete è in grado di generare delle soluzioni relative ad un nuovo sconosciuto insieme di dati. La componente di base delle reti neurali è il “nodo” che rappresenta l'unità di processo in cui risiede l'algoritmo di calcolo. Il nodo riceve un vettore di segnali di input che viene opportunamente pesato, sulla base di un vettore di pesi e quindi trasmesso ad altre unità, producendo un vettore di output. Il numero di unità ed il tipo di connessione esistente tra i nodi definisce l'architettura della rete (AAVV, 1998). Questa metodica è stata applicata da Mancuso and Nicese (1999) per valutare la qualità degli oli vergini di oliva in base ai dati dei composti volatili dello spazio di testa.

2 – OBIETTIVI DELLA RICERCA

2.1 – PREMESSA

La coltivazione dell'olivo in prossimità dei laghi lombardi trova una duplice motivazione: conferisce alle zone ad elevato interesse turistico un piacevole ed armonico panorama paesaggistico; ed offre un olio come "prodotto di nicchia", disponibile in quantità limitata e dotato di caratteristiche qualitative proprie ed uniche.

Facendo seguito ai regolamenti CE n. 2078 e 2081 del 1992, relativi alla qualità ed alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine dei prodotti agricoli ed alimentari, sono state riconosciute due distinte denominazioni di origine (Bollettino Ufficiale Regione Lombardia, 1998. Allegati B e C): DOP "Laghi Lombardi" accompagnata dalle dizioni "Sebino" e "Lario", e DOP "Garda" seguita dalle menzioni geografiche "Trentino", "Orientale" e "Bresciano". Il disciplinare di produzione per l'olio di oliva extra vergine DOP "Garda bresciano" prevede controlli sull'origine dei frutti, sulle caratteristiche pedo-climatiche, sui tempi di raccolta, sulle modalità di lavorazione al frantoio e sulle caratteristiche dell'olio: acidità $\leq 0,6\%$, perossidi ≤ 12 meq O_2/kg , acido oleico $\geq 74\%$, panel test ≥ 7 , colore verde-giallo, odore fruttato medio-leggero, sapore di amaro leggero e sensazione lieve di piccante.

Prima del riconoscimento delle DOP, solo poche indagini (Carazzolo *et al.*, 1999; Gigliotti *et al.*, 1992a, 1992b e 1993b; Poiana *et al.*, 1999; Tonutti, 2001) sono state effettuate allo scopo di caratterizzare la produzione oleicola della riviera gardesana, ma il crescente e continuo interesse verso la qualità dell'olio vergine di oliva lombardo ha reso necessario l'attuazione di numerose linee di ricerca atte a chiarire ed ordinare la grande quantità di biotipi di olivo presenti nella zona del lago di Garda. Gli studi sulla caratterizzazione varietale gardesana hanno riguardato sia gli aspetti morfologici e fisiologici dell'olivo, sia le caratteristiche chimiche, fisiche ed organolettiche degli oli monovarietali. Gli aspetti morfologici e fisiologici dell'olivo, studiati da Pedò (1999-2000) e Zeni (1999-2000), hanno permesso di stilare scheda elaiotecniche di ogni cultivar in osservazione, riassumendo il comportamento agronomico della pianta, la sua biologia fiorale, ed i dati biometrici principali. Dalle caratteristiche chimiche, fisiche ed organolettiche degli oli monovarietali, Bergonzi (2000-2001) ha trovato i parametri analitici, caratterizzati da un elevato coefficiente di discriminazione, che consentono la differenziazione varietale; Tura *et al.* (2002) hanno ottenuto un dendogramma di similarità basato sul profilo sensoriale, delle correlazioni lineari e delle regressioni multiple tra le note sensoriali ed i composti volatili e polifenolici; Pedò *et al.* (2002) hanno costruito un dendogramma di similarità basato sul profilo aromatico, e delle relazioni tra la stabilità all'autossidazione con l'indice di maturazione ed il contenuto in polifenoli e tocoferoli; Boni (2001-2002) ha confrontato i dati analitici degli oli di oliva vergini gardesani freschi e dopo sei mesi di conservazione; Chiarulli (1999-2000) ha confrontato i dati analitici degli oli di oliva vergini gardesani ottenuti usando tecniche cromatografiche con quelli di risonanza magnetica nucleare al fine di individuare una metodica semplice, veloce ed affidabile per la caratterizzazione chemiometrica; Bassi *et al.* (2002a) hanno caratterizzato alcune accessioni in base alla composizione dell'olio, agli aspetti morfologici dell'olivo ed a markers molecolari estratti dalle foglie, così come Testolin *et al.* (2000) hanno identificato alcune varietà del Garda orientale analizzando il patrimonio genetico delle cultivar di olivo.

Sono stati condotti, inoltre, alcuni studi sull'interazione tra l'ambiente e la qualità dell'olio di oliva vergine ottenuto dalle cultivar maggiormente diffuse sul territorio del Garda bresciano. Pedò (1999-2000) ha studiato l'interazione tra le varietà "Casaliva" e "Leccino" con le variabili ambientali, con particolare riferimento al loro stato nutrizionale in condizioni pedo-climatiche differenti. Bassi *et al.* (2002b), Failla *et al.* (2002) e Pedò *et al.* (2003) hanno condotto ricerche sull'influenza dell'ambiente gardesano sulla qualità dell'olio, con particolare riferimento alla maturazione, al contenuto in tocoferoli e polifenoli, ed alla loro stabilità all'autossidazione.

Una ricerca sull'origine geografica su scala nazionale è stata condotta da Mannina *et al.* (2001) utilizzando NMR ^1H come metodica analitica per identificare e riconoscere gli oli lombardi da quelli di altri siti italiani.

Lo scopo di questo dottorato di ricerca era quello di studiare l'influenza del genotipo e dell'ambiente sulla qualità dell'olio vergine di oliva. L'attività di ricerca ha riguardato, inoltre, due soggiorni di studio: il primo presso la "Charles Sturt University" di Wagga Wagga nel New South Wales (Australia), che ha permesso di approfondire alcuni aspetti analitici riguardanti la qualità dell'olio vergine di oliva, in particolare sui composti volatili; il secondo presso l'"Istituto de la Grasa" di Siviglia (Spagna), dove è stato possibile studiare come i fattori cultivar e maturazione interferiscono sugli enzimi della via metabolica delle "lipossigenasi".

2.2 – GENOTIPO E QUALITÀ

Le cultivar di olivo e gli oli da essi ottenuti possiedono alcuni attributi propri che permangono costanti e che permettono loro di essere riconosciuti e distinti da altri. La caratterizzazione ha come fine quello di definire e determinare i parametri analitici e sensoriali idonei a riconoscere qualitativamente la tipicità del prodotto.

2.2.1 – Caratterizzazione chemiometrica

Il crescente interesse per la valorizzazione ed il miglioramento dell'olivicoltura gardesana ha portato allo sviluppo di questo obiettivo, il quale è stato sviluppato caratterizzando dal punto di vista chemiometrico gli oli monovarietali delle cultivar di olivo presenti nella riviera gardesana, raccolte in una collezione nelle stesse condizioni pedo-climatiche.

2.2.2 – Caratterizzazione enzimatica

Studiare l'influenza genetica sulla qualità dell'olio vergine significa anche definire quali siano i fattori che interferiscono sugli enzimi della via metabolica della "lipossigenasi", che a sua volta regola la sintesi dei composti volatili C_6 . Per questo motivo è stato studiato come cambia l'attività enzimatica in alcune cultivar di maggior interesse nell'area gardesana in funzione della maturazione dei frutti.

2.2.3 – Caratterizzazione aromatica

Lo scopo di questo lavoro era quello di investigare l'influenza della cultivar, dell'epoca di raccolta e del processo di lavorazione sul profilo aromatico degli oli vergini di oliva commerciali. Si voleva indagare, inoltre, la fattibilità dell'uso della micro-estrazione in fase solida (SPME) e della gas-cromatografia (GC) per il raggiungimento di tale obiettivo.

2.3 – AMBIENTE E QUALITA'

Le cultivar di olivo e gli oli da essi ottenuti presentano una grande variabilità morfologia, fisiologica e qualitativa a fronte dei diversi stimoli ambientali (clima, pedologia), delle tecniche colturali (irrigazione, concimazione, gestione del suolo, potatura), e delle avversità parassitarie.

2.3.1 – Influenze nell'area gardesana

Lo scopo di questo obiettivo era quello di osservare l'influenza dell'ambiente e del meso-clima gardesano sulla qualità degli oli monovarietalmente ivi ottenuti. Questo punto è stato sviluppato considerando le variazioni chemiometriche degli oli ottenuti da cultivar uguali in diverse aziende olivicole gardesane e studiando le differenze tra le cultivar, tra i siti, tra gli anni e le loro interazioni.

2.3.2 – Influenze regionali in Italia

Al fine di osservare l'influenza pedo-climatica ed ambientale su scala nazionale, è stato condotto uno studio di confronto qualitativo tra oli di oliva vergini della stessa varietà ottenuti in zone olivicole italiane differenti, facendo diversi prelievi in base alla maturazione. Lo studio di questo obiettivo è stato condotto confrontando la qualità degli oli ottenuti dalla stessa cultivar con differenti stadi di maturazione (verde, invaiato e maturo) in tre siti italiani diversi (nord, centro e sud).

3 – METODOLOGIE

3.1 – CAMPIONAMENTI

Il piano sperimentale di campionamento prevedeva due livelli di indagine: l'influenza del genotipo, suddiviso in caratterizzazione chemiometrica, enzimatica, ed aromatica; e l'influenza dell'ambiente (confronto tra alcuni siti olivicoli gardesani ed italiani) sulla qualità.

3.1.1 – Genotipo e qualità: caratterizzazione chemiometrica

Al fini di caratterizzare gli oli monovarietali (profilo elaiochimico) sono stati analizzati 61 campioni di olio ottenuti da 18 cultivar, allevate tutte nelle medesime condizioni pedo-climatiche in una collezione varietale sita sulla sponda bresciana del lago di Garda a Raffa di Puegnago (BS), e raccolte all'invaiaitura durante 4 campagne olivicole, dal 1998 al 2001, compatibilmente con le produzioni annuali di "carica" e "scarica".

Nella tabella 1 sono indicate le date di raccolta dei campionamenti degli oli ottenuti ed analizzati. Nel 1999 le cultivar Favarol, Miniol e Mitria sono state lavorate ed analizzate in doppio per verificare la riproducibilità e la precisione delle analisi.

Tabella 1 – Oli ottenuti per la caratterizzazione chemiometrica nei 4 anni di osservazione.

SIGLA E NOME DELLA CULTIVAR	1998	1999	2000	2001
BA – Baia	17 Nov.	10 Nov.	-	12 Nov.
CD - Casaliva 2	17 Nov.	22 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
CG - Casaliva 1	17 Nov.	22 Nov.	26 Nov.	12 Nov.
CO - Cornarol	18 Nov.	10 Nov.	-	15 Nov.
FF - Favarol	18 Nov.	10 Nov. (x2)	-	12 Nov.
FR - Frantoio	17 Nov.	22 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
GA - Gargnà	26 Nov.	10 Nov.	-	12 Nov.
GR - Grignano	10 Nov.	9 Nov.	-	12 Nov.
LC - Leccino	10 Nov.	10 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
LS - Less	18 Nov.	9 Nov.	-	12 Nov.
MC - Miniol	18 Nov.	9 Nov. (x2)	-	15 Nov.
MT - Mitria	18 Nov.	22 Nov. (x2)	-	15 Nov.
MU - Maurino	26 Nov.	22 Nov.	-	12 Nov.
PE - Pendolino	13 Nov.	10 Nov.	15 Nov.	-
RA - Raza	26 Nov.	22 Nov.	-	14 Nov.
RE - Regina	10 Nov.	10 Nov.	-	14 Nov.
RO - Rossanello	26 Nov.	22 Nov.	-	12 Nov.
TR - Trepp	18 Nov.	10 Nov.	-	12 Nov.

- campione non disponibile per l'annata di "scarica"

3.1.2 – Genotipo e qualità: caratterizzazione enzimatica

Per studiare l'attività degli enzimi della via della "lipossigenasi", responsabili della biogenesi dei composti C₆ (che conferiscono sostanzialmente la sensazione di fruttato erbaceo e note verdi nell'olio vergine), sono state raccolte le olive di 3 varietà (Casaliva, Frantoio e Leccino), site nella collezione varietale di Raffa di Puegnago (BS), in 2 anni (2000 e 2001), in 11 epoche di maturazione da agosto a dicembre (tabella 2). I campionamenti sono stati eseguiti ogni 3 settimane nelle fasi iniziali della maturazione (agosto e

settembre), ogni settimana nella fase centrale dell'invasatura delle drupe (novembre), ed ogni 2 settimane nella fase intermedia e finale (ottobre e dicembre).

Tabella 2 – Date di raccolta delle olive per la caratterizzazione enzimatica nei 2 anni di osservazione.

ANNI	Agosto		Settembre		Ottobre			Novembre		Dicembre	
2000	11	1	22	6	20	27	3	10	17	1	15
2001	8	29	19	3	17	24	31	7	14	28	12

I 22 campionamenti delle drupe sono stati congelati con azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione e del dosaggio enzimatico.

3.1.3 – Genotipo e qualità: caratterizzazione aromatica

Tabella 3 – Oli commerciali utilizzati per lo studio del profilo aromatico: varietà ed indici di lavorazione.

N° OLIO	RACCOLTA	CULTIVAR	MATURAZIONE	GRAMOLAZIONE	RESA OLIO
1	stagione 2000	-	-	-	-
2	21 maggio 2001	Verdale	eccellente	50 min	10,1%
3	21 maggio 2001	Verdale	eccellente	50 min	10,1%
4	21 maggio 2001	Corregiola	60% verde	40 min	13,3%
5	24 maggio 2001	Frantoio	sconosciuta	60 min	15,3%
6	1 agosto 2001	Sevillano	sconosciuta	60 min	11,5%
7	30 maggio 2001	Miscela	100% nera	30 min	17,1%
8	4 giugno 2001	Miscela	95% nera	45 min	7,8%
9	7 giugno 2001	Miscela	80% nera	45 min	16,3%
10	7 giugno 2001	Corregiola	95% verde	60 min	13,8%
11	13 giugno 2001	Miscela	95% nera	50 min	12,2%
12	20 giugno 2001	Miscela	85% nera	50 min	18,2%
13	28 giugno 2001	Miscela	95% nera	60 min	17,9%
14	19 luglio 2001	Manzanillo	100% nera	75 min	13,1%
15	26 luglio 2001	Corregiola	60% verde	60 min	16,8%
16	26 luglio 2001	Miscela	90% nera	90 min	29,1%
17	26 luglio 2001	Ferals	90% nera	75 min	25,3%
18	7 agosto 2001	Corregiola	90% nera	60 min	13,9%
19	10 agosto 2001	Manzanillo	100% nera	60 min	9,5%
20	1 agosto 2001	Miscela	95% nera	60 min	17,4%
21	7 agosto 2001	CSU – miscela	100% nera	65 min	14,2%
22	10 agosto 2001	Sconosciuta	90% nera	60 min	12,7%
23	15 maggio 2001	Miscela	50% verde	non registrata	10,0%
24	25 giugno 2001	Miscela	100% nera	40 min	17,7%
25	25 giugno 2001	Paragon	100% nera	45 min	47,4%
26	28 giugno 2001	Corregiola	70% verde	60 min	18,1%
27	10 agosto 2001	Sconosciuta	90% nera	60 min	12,7%
28	25 giugno 2001	Paragon	100% nera	45 min	47,4%
29	2 luglio 2001	Manzanillo	80% nera	60 min	10,6%
30	2 luglio 2001	Manzanillo	80% nera	60 min	10,6%
31	6 luglio 2001	Corregiola	85% verde	60 min	16,7%
32	9 luglio 2001	Manzanillo	100% nera	50 min	13,9%
33	stagione 2000	-	-	-	-
34	stagione 2000	-	-	-	-
35	stagione 2000	-	-	-	-
36	Prova di ossidazione	olio rancido	-	-	-
37	15 maggio 2001	Verdale	75% verde	-	9,0%
38	15 maggio 2001	Sconosciuta	60% verde	-	10,0%
39	4 luglio 2001	CSU – miscela	100% nera	-	18,0%
40	27 luglio 2001	CSU – miscela	100% nera	-	18,0%

- dato non fornito dal produttore

Lo studio dei composti volatili si è concentrato su 40 campioni di oli commerciali provenienti dalle aziende olivicole dalla "Riverina Valley" nel sud-ovest del New South Wales (Australia), nelle vicinanze di Wagga Wagga. Gli oli commerciali sono stati ottenuti dalla raccolta di diverse varietà di olive cresciute localmente negli anni 2000 e 2001, a diverse epoche di maturazione. Le olive sono state lavorate entro un giorno dalla raccolta con due piccoli frantoi diversi (meno di 500 litri per partita): un decanter a 2 fasi ed una pressa tradizionale a fiscoli. I dati nella tabella 3 sono stati forniti dal produttore ed indicano: la data di raccolta delle olive, la cultivar, la maturazione dei frutti, il tempo di gramolazione (a temperatura costante) e la resa in olio. Mancano i dati dei campioni di olio del 2000 perché non è stato possibile recuperarli. La varietà indicata come "miscela" indica che sono state lavorate insieme più cultivar di olive. Alcuni campioni (2 e 3, 22 e 27, 25 e 28, 29 e 30, 39 e 40) sono stati analizzati in doppio per osservare la riproducibilità e la precisione dell'analisi. Il campione 21, inoltre, è stato ottenuto dalla stessa miscela di olive dei campioni 39 e 40, ma è stato lavorato in modo diverso: l'olio 21 con un decanter a 2 fasi, e gli oli 39 e 40 con un mulino in pietra ed una pressa a fiscoli. La resa dei campioni 25 e 28 è risultata apparentemente elevata in quanto era una piccola partita di olive lavorata a fine giornata, e quindi l'olio ottenuto era mescolato con il residuo di quelli lavorati prima, facendone aumentare il quantitativo estratto. I campioni 1, 33, 34 e 35 sono stati lavorati nel 2000 e stoccati in modo opportuno per conservare l'aroma fino al 2001 per essere analizzati; il campione 36 è stato conservato deliberatamente per più di 12 mesi in un contenitore di plastica chiaro esposto al calore ed alla luce per indurre l'irrancidimento; tutti gli altri campioni di olio sono stati lavorati ed analizzati nel 2001. In laboratorio sono stati ottenuti oli della cultivar Corregiola (1kg), tramite un mini-frangitore Abencor (frangitore a martelli, gramola e centrifuga) entro un giorno dalla raccolta, per studiare l'effetto della lavorazione. I parametri di gramolazione sono stati: temperature di 25°C e 35°C, e tempi di 15 e 60 minuti.

3.1.4 – Ambiente e qualità: influenze nell'area gardesana

Questo approccio intendeva valutare l'interazione dell'ambiente del lago di Garda sulla qualità di oli monovarietalici. Sono stati ottenuti 77 campioni di olio dalle cultivar Casaliva, Frantoio, Leccino e Pendolino raccolte al momento dell'invasatura in 17 aziende olivicole del Garda bresciano.

La tabella 4 mostra le aziende ed i siti olivicoli gardesani in cui sono stati effettuati i campionamenti, le cultivar e le date di raccolta nelle 4 campagne olivicole (1998, 1999, 2000 e 2001). Della cultivar Casaliva sono presenti tre campioni, "Alto Garda", "Drizzar" e "Raza", a seconda del luogo di origine e dai nomi attribuiti dagli olivicoltori, ma sono tutte appartenenti alla stessa cultivar. Nell'azienda "Cominciali" la cultivar Casaliva è stata campionata in doppio (nel 1998 e 2000), per osservare eventuali variazioni di alleggione a seguito di trattamenti spray con boro. Nell'azienda "Vezzosa" la cultivar Leccino è stata raccolta in triplo (nel 1998 e 2000), per indagare su possibili cambi di rese con diversi regimi di irrigazione.

3.1.5 – Ambiente e qualità: influenze regionali in Italia

Per osservare l'influenza pedo-climatica su scala nazionale, sono stati analizzati 33 campioni di olio (tabella 5) ottenuti da 3 cultivar di olive (Casaliva, Frantoio e Leccino) in 3 epoche di maturazione (verde, invaiata e matura) in 2 anni (2000 e 2001), in 3 regioni ben distinte tra loro (Lombardia, Toscana ed Abruzzo). Per il nord si è fatto riferimento alla collezione varietale a Raffa di Puegnago (BS), mentre per le altre due regioni i campioni provengono dai campi sperimentali dell'Istituto di Propagazione delle Specie Legnose del C.N.R. di Firenze a Follonica (GR) e dell'Istituto Sperimentale per l'Elaiotecnica a Città S. Angelo (PE).

Tabella 4 – Oli utilizzati per studiare le influenze nell’area gardesana sulla qualità.

SIGLA, NOME E LOCALITÀ DELL’AZIENDA	SIGLA E NOME DELLA CULTIVAR	1998	1999	2000	2001
BE – Bertazzi (Polpenazze, BS)	LC – Leccino	5 Nov.	-	5 Nov.	-
BI – Bianchi (Polpenazze, BS)	CA – Casaliva	13 Nov.	7 Nov.	11 Nov.	-
CC – Comincioli C. (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	-	-	26 Nov.	-
CO – Comincioli (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	26 Nov.	25 Nov.	11 Nov.	-
	CA – Casaliva (trattata con boro)	26 Nov.	-	11 Nov.	-
CV – Cavazza (S. Felice del Benaco, BS)	LC – Leccino	10 Nov.	31 Ott.	-	-
FA – Franzosi (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	17 Nov.	8 Nov.	11 Nov.	-
	LC – Leccino	17 Nov.	8 Nov.	5 Nov.	-
	PE – Pendolino	17 Nov.	8 Nov.	5 Nov.	-
FE – Freddi (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	13 Nov.	-	11 Nov.	-
	LC – Leccino	13 Nov.	1 Nov.	5 Nov.	-
	PE – Pendolino	-	7 Nov.	5 Nov.	-
GI – Girardi (Limone, BS)	CA – Casaliva 1 (Alto Garda)	20 Nov.	-	-	-
LF - Leali F. (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	-	7 Nov.	11 Nov.	-
	PE – Pendolino	-	7 Nov.	5 Nov.	-
MA – Mazzoldi (Raffa di Puegnago, BS)	CA – Casaliva 2 (Drizzar)	17 Nov.	22 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
	CA – Casaliva 1 (Alto Garda)	17 Nov.	22 Nov.	26 Nov.	12 Nov.
	FR – Frantoio	17 Nov.	22 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
	LC – Leccino	10 Nov.	10 Nov.	15 Nov.	12 Nov.
	PE – Pendolino	13 Nov.	10 Nov.	15 Nov.	-
	CA – Casaliva (Raza)	26 Nov.	22 Nov.	-	14 Nov.
RM – Ramanzini (Desenzano, BS)	CA – Casaliva	17 Nov.	9 Nov.	-	-
	LC – Leccino	17 Nov.	9 Nov.	-	-
RZ – Razza (Padenghe, BS)	LC – Leccino	5 Nov.	-	-	-
TR –Trevisani (Garganano, BS)	CA – Casaliva (Raza)	20 Nov.	-	-	-
VI – Vivenzi (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	-	8 Nov.	11 Nov.	-
	LC – Leccino	-	8 Nov.	5 Nov.	-
VN – Venturelli (Puegnago, BS)	CA – Casaliva	-	-	-	-
	LC – Leccino	13 Nov.	1 Nov.	5 Nov.	-
VZ – Vezzola (S. Felice, BS)	LC – Leccino (senza irrigazione)	13 Nov.	-	5 Nov.	-
	LC – Leccino (irrigazione semplice)	13 Nov.	-	5 Nov.	-
	LC – Leccino (irrigazione doppia)	13 Nov.	-	5 Nov.	-
ZI – Ziglioli (Puegnago, BS)	LC – Leccino	13 Nov.	31 Ott.	-	-

- campione non disponibile per l’annata di “scarica”

Tabella 5 – Oli utilizzati per studiare le influenze regionali in Italia sulla qualità.

REGIONE	SIGLA E NOME DELLA CULTIVAR	MATURAZIONE	2000	2001
Abruzzo (Città S. Angelo, PE)	CA – Casaliva	verde	24 Ott.	-
		invaiaura	14 Nov.	-
	FR – Frantoio	verde	24 Ott.	-
		invaiaura	14 Nov.	-
Toscana (Follonica, GR)	LC – Leccino	verde	24 Ott.	10 Ott.
		invaiaura	14 Nov.	7 Nov.
	FR – Frantoio	verde	17 Ott.	-
		invaiaura	8 Nov.	20 Nov.
LC – Leccino	maturazione	4 Dic.	-	
	verde	17 Ott.	-	
Lombardia (Raffa di Puegnago, BS)	CA – Casaliva	invaiaura	8 Nov.	20 Nov.
		maturazione	4 Dic.	-
	FR – Frantoio	verde	25 Ott.	25 Ott.
		invaiaura	15 Nov.	12 Nov.
	LC – Leccino	maturazione	6 Dic.	12 Dic.
		verde	20 Ott.	25 Ott.
LC – Leccino	invaiaura	15 Nov.	12 Nov.	
	maturazione	6 Dic.	12 Dic.	

- campione non disponibile per l’annata di “scarica”

3.2 – DETERMINAZIONI SULLE OLIVE

Sui campioni di olive, prima dell'estrazione dell'olio, è stato determinato l'indice di maturazione, e la composizione in acqua ed olio.

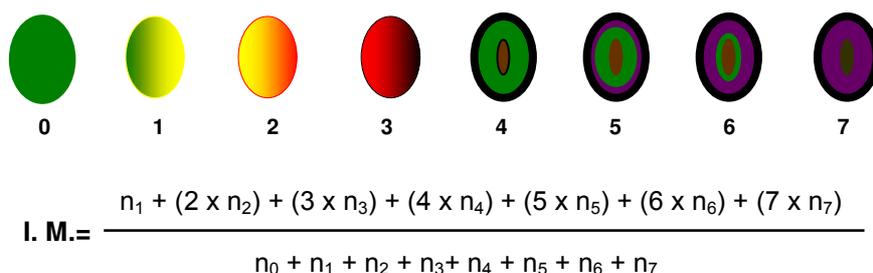
3.2.1 – Indice di maturazione

Prima della lavorazione delle drupe si è provveduto a definire l'indici di maturazione (I.M.) secondo quanto proposto dalla stazione olivicola di Jaen (Uceda, 1983).

La scelta del momento della raccolta delle olive è importante per ottimizzare la produzione sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo. La maturazione ideale dovrebbe essere l'epoca in cui il frutto ha raggiunto la massima inolizione e l'olio presenta le caratteristiche chimiche, organolettiche, antiossidanti e nutrizionali di maggior pregio. La variazione del colore della drupa come indice di maturazione mette in relazione la quantità di olio che si trova nel frutto e la sua qualità.

Vengono prelevate a caso, dopo una miscelazione omogenea delle drupe, circa 100 olive, le quali sono suddivise in 8 classi di maturazione in base alla colorazione dell'epicarpo e della polpa.

Figura 1 – Metodologia utilizzata per calcolare l'indice di maturazione.



Nella figura 1 è schematizzata la metodologia usata, in cui n_i sono il numero di drupe appartenenti alle seguenti classi di maturazione:

- 0 = olive con epicarpo verde intenso e/o scuro;
- 1 = olive con epicarpo verde giallognolo o giallo;
- 2 = olive con epicarpo giallognolo a macchie o zone rossastre;
- 3 = olive con epicarpo rossastro o violetto chiaro;
- 4 = olive con epicarpo nero e mesocarpo totalmente verde;
- 5 = olive con epicarpo nero e mesocarpo invaiato per un terzo;
- 6 = olive con epicarpo nero e mesocarpo invaiato per due terzi;
- 7 = olive con epicarpo nero e mesocarpo totalmente invaiato.

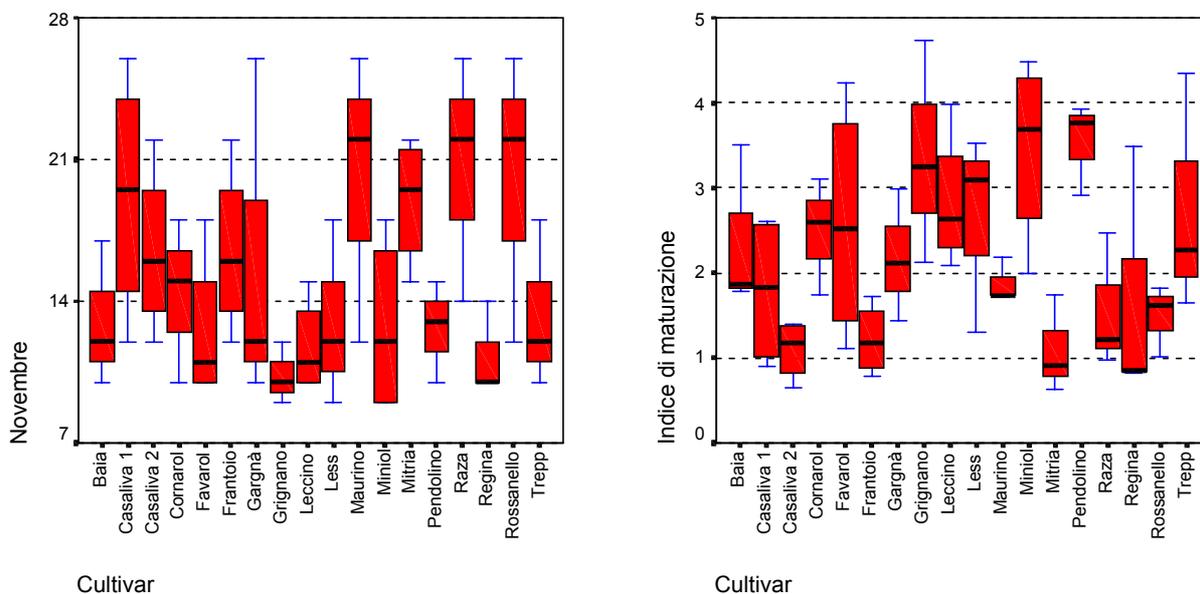
L'indice di maturazione è determinato dalla sommatoria del numero di olive per ogni classe moltiplicato per il coefficiente della classe a cui appartiene diviso il numero totale di olive.

Indicativamente il periodo ottimale di raccolta corrisponde ad un indice di maturazione pari a 3, ma questo valore deve essere ottimizzato in funzione della zona di produzione, della varietà e dei parametri qualitativi dell'olio ottenuto in coincidenza con l'indice prescelto.

La figura 2 mostra gli intervalli di raccolta e gli indici di maturazione delle olive per ottenere gli oli per la caratterizzazione chemiometrica. I raccolti sono stati effettuati allo stadio invaiato: nella seconda settimana

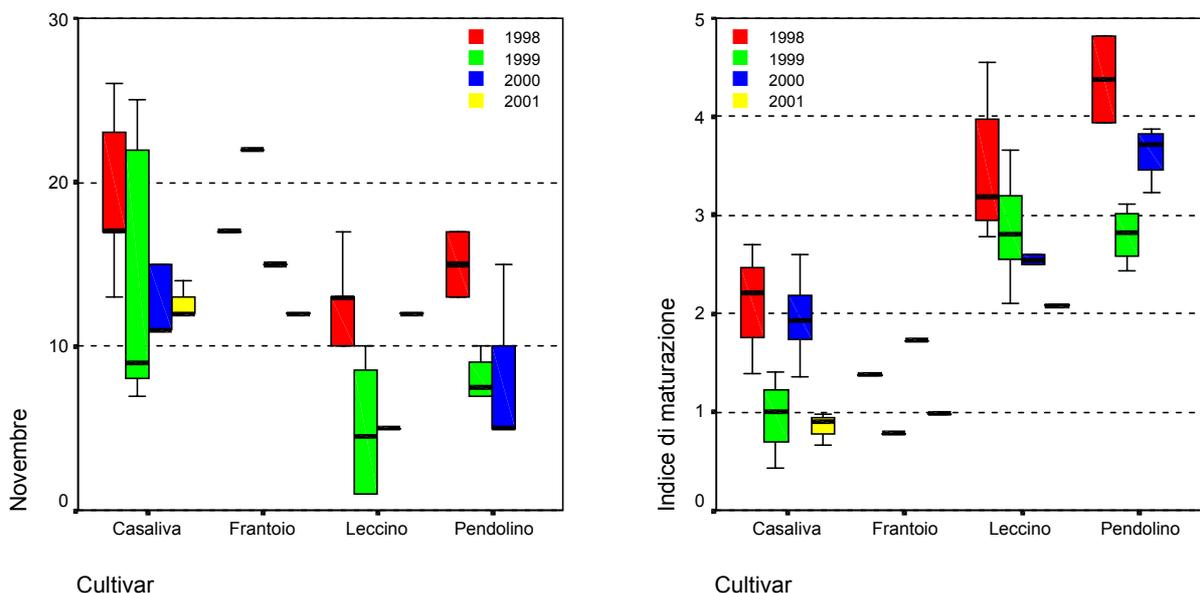
di novembre le varietà precoci (Baia, Favarol, Gargnà, Grignano, Leccino, Less, Miniol, Pendolino, Regina e Trepp), nella terza le cultivar a maturazione intermedia (Casaliva 1, Casaliva 2, Cornarol, Frantoio e Mitria), e nell'ultima quelle tardive (Maurino, Raza e Rossanello). La maturazione era tra lo stato verde-giallo dell'epicarpo delle olive (0,64 per Casaliva 2) e lo stato maturo con buccia nera e polpa per un terzo rossa della drupa (4,73 per Grignano), mediamente i raccolti erano invaiati con epicarpo rosso-violaceo (2,20).

Figura 2 – Olive utilizzate per la caratterizzazione chemiometrica degli oli: raccolta ed indici di maturazione.



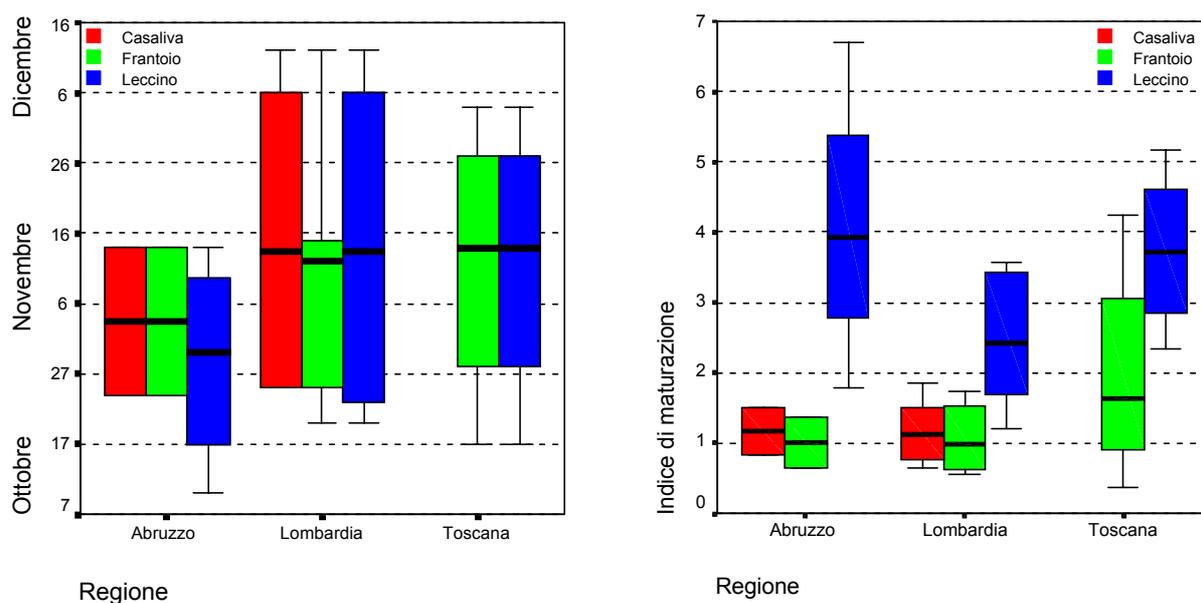
La figura 3 mostra gli intervalli di raccolta e gli indici di maturazione delle olive utilizzate per ottenere gli oli dell'area gardesana. La raccolta è avvenuta nel mese di novembre: Casaliva e Frantoio (tardive) sono state raccolte principalmente nella seconda e terza decade, con indici di maturazione compresi tra 0,5 e 2,5 circa (epicarpo da verde ad invaiato); mentre Leccino e Pendolino (precoci) sono state raccolte nella prima ed inizio seconda decade, con indici di maturazione tra 2 e 5 circa (epicarpo da invaiato a nero).

Figura 3 – Olive utilizzate per le influenze nell'area gardesana degli oli: raccolta ed indici di maturazione.



La figura 4 mostra gli intervalli di raccolta e gli indici di maturazione delle olive utilizzate per ottenere gli oli nelle tre regioni italiane. In Abruzzo, mancando lo stadio “maturo”, i campionamenti si sono concentrati nella fine di ottobre ed agli inizi di novembre, con indici di maturazione medi di circa 1,2 per Casaliva, 1,0 per Frantoio e 4,0 per Leccino; in Lombardia i raccolti sono stati eseguiti dalla fine di ottobre fino ai primi di dicembre, ottenendo olive con indici di maturazione medi di circa 1,2 per Casaliva, 1,0 per Frantoio e 2,5 per Leccino; in Toscana sono state campionate solo Frantoio e Leccino a partire dalla metà di ottobre fino alla fine di novembre, raccogliendo olive con indici di maturazione medi di circa 1,7 per Frantoio e 3,6 per Leccino.

Figura 4 – Olive utilizzate per le influenze regionali in Italia degli oli: raccolta ed indici di maturazione.



3.2.2 – Contenuto in acqua e grado d’inolizione

La quantità di olio contenuta nelle olive è stata determinata con il metodo Soxhlet. In provettoni di cellulosa (35mm x 150mm – Schleicher & Schuell) è stata messa circa 150g di pasta di olive, è stata congelata a -30°C e successivamente liofilizzata, ricavando il contenuto in acqua per differenza di peso:

$$\%H_2O = (\text{peso fresco} - \text{peso liofilizzato}) * 100 / \text{peso fresco}.$$

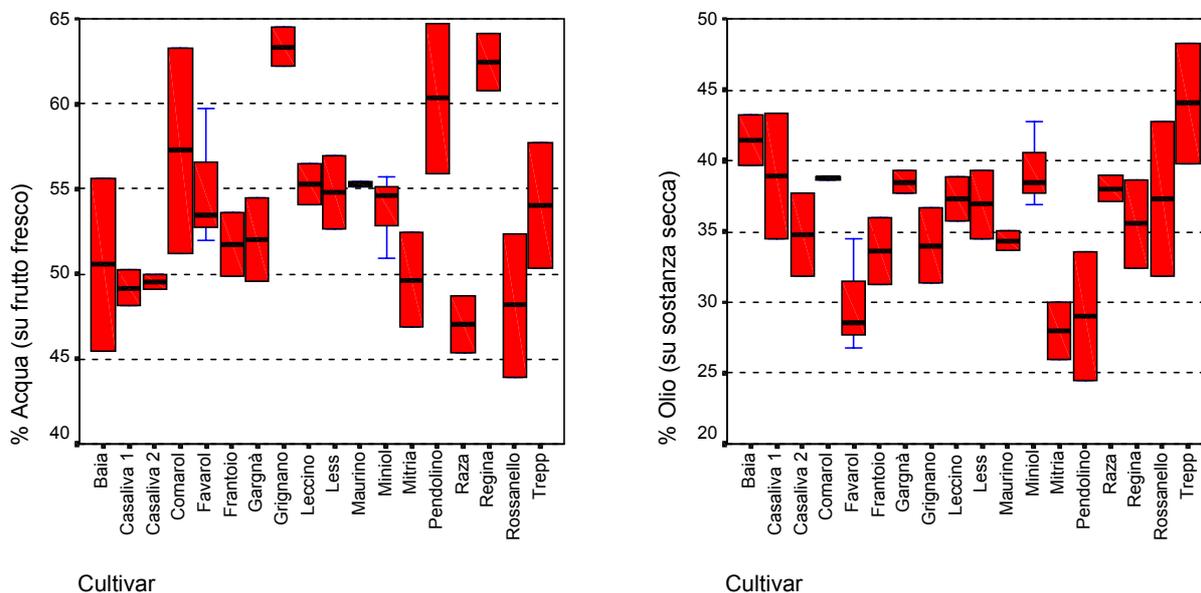
La pasta liofilizzata è stata posta con circa 500ml di etere di petrolio nell’estrattore per 8 ore. Il solvente è stato fatto evaporare con un evaporatore rotante sottovuoto, ottenendo così la quantità di olio per differenza di peso.

Il grado di inolizione è stato calcolato come:

$$\%OLIO = \text{peso olio} * 100 / \text{peso pasta liofilizzata}.$$

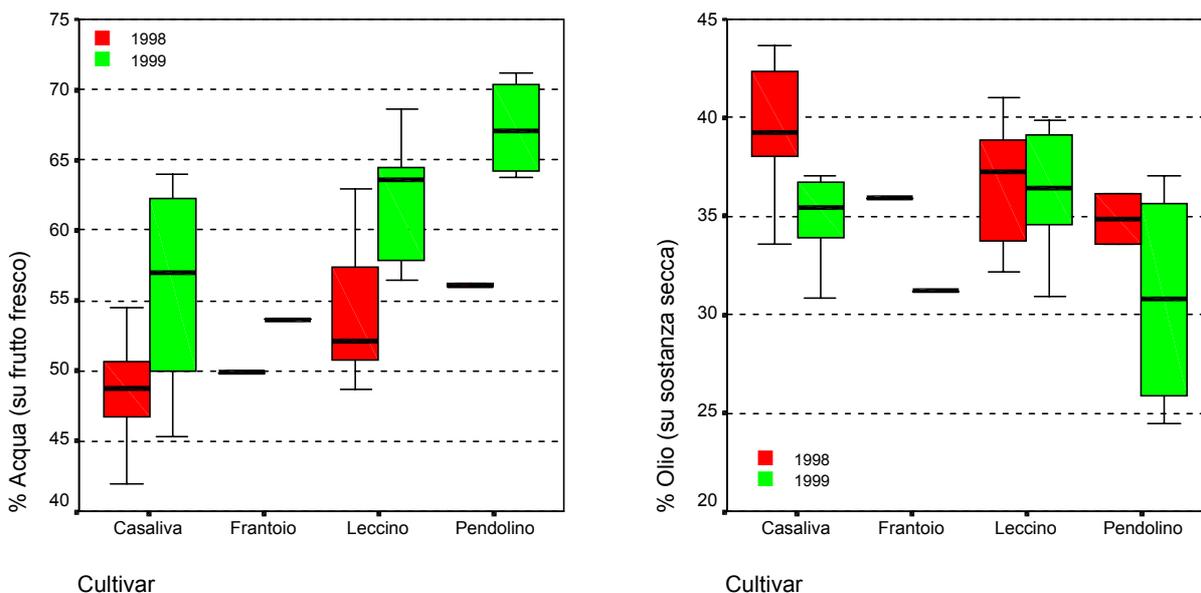
La figura 5 indica il contenuto in acqua ed in olio dei campioni di olive raccolti per ottenere di oli per la caratterizzazione chemiometrica: il contenuto percentuale di acqua sul peso fresco varia da 43,97% per Rossanello a 64,75% per Pendolino, con una media del 53,88%; mentre la quantità di olio sul peso secco cambia da 24,45% per Pendolino a 48,29% per Trepp, con un contenuto medio del 36,02%.

Figura 5 – Olive utilizzate per la caratterizzazione chemiometrica degli oli: contenuto in acqua ed olio.



La figura 6 mostra la composizione delle drupe raccolte per ottenere gli oli nell'area gardesana. Il contenuto in acqua ed olio oscilla molto negli anni a causa delle condizioni metereologiche, e complessivamente si osserva che nel 1998 le drupe avevano meno acqua e più olio rispetto al 1999.

Figura 6 – Olive utilizzate per le influenze nell'area gardesana degli oli: contenuto in acqua e olio.



3.2.3 – Lavorazione delle olive

I campioni di olio monovarietali sono stati ottenuti, dopo la raccolta e le operazioni preliminari di pulizia e lavaggio delle olive, utilizzando un micro-oleificio costruito appositamente, disponibile presso il Di.Pro.Ve. (sezione Coltivazioni Arboree) dell'università di Milano, lavorando le olive entro 24 ore dalla raccolta.

Lo schema di lavorazione, indicato in figura 7, consiste in un sistema discontinuo, che prevede:

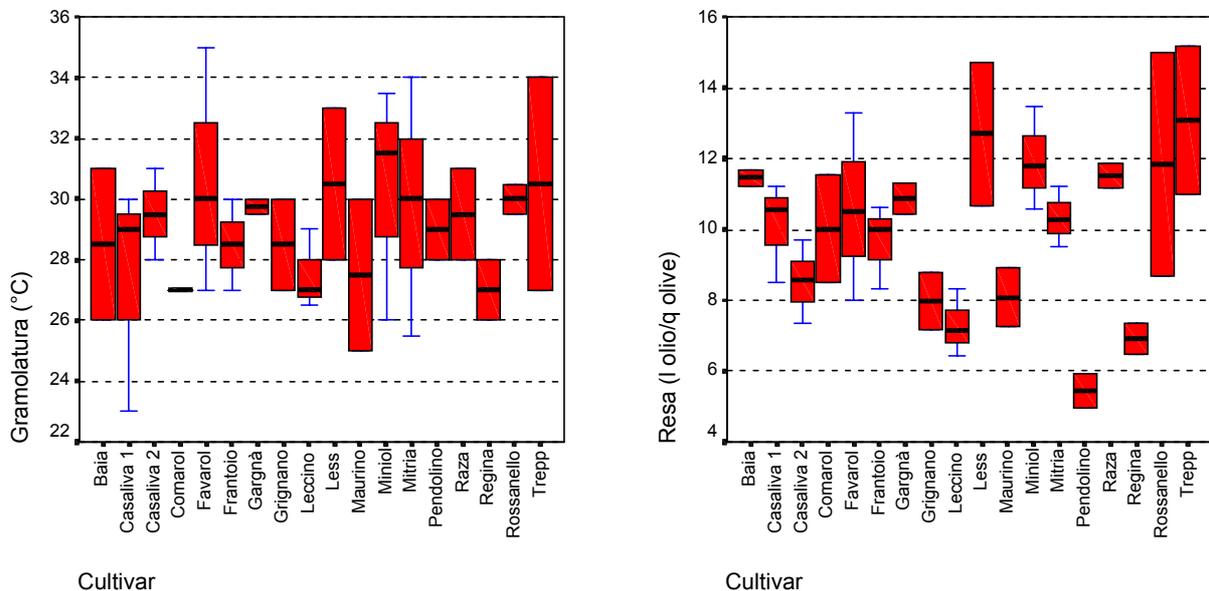
- la raccolta manuale di circa 6-10kg di olive ed il trasporto in cassette ben aerate al micro-oleificio;
- la pulizia da foglie, sassi, ecc. ed il calcolo dell'indice di maturazione, come descritto precedentemente;
- la pesata delle olive ed il lavaggio con acqua tiepida <math><30^{\circ}\text{C}</math>, per eliminare residui terrosi e di fitosanitari;
- la frangitura con un mulino a martelli a bassa velocità in grado di schiacciare e frantumare esaustivamente le olive per far fuoriuscire il mosto dalle cellule del mesocarpo;
- la gramolazione a circa - l'estrazione del mosto dalla pasta di olive con una pressa idraulica verticale, di piccole dimensioni, con fiscoli in acciaio (diametro di 20cm) fino al raggiungimento di 200 bar (circa la metà della pressione esercitata industrialmente);
- la separazione dell'olio dal mosto mediante centrifugazione a 2000 giri/min per 5 minuti;
- la determinazione del volume di olio ottenuto per calcolare insieme alla pesata, anche la resa di estrazione;
- Il confezionamento in bottiglie di vetro scuro;
- ed infine, la conservazione al buio in cella frigorifera

Figura 7 – Schema di lavorazione delle olive.



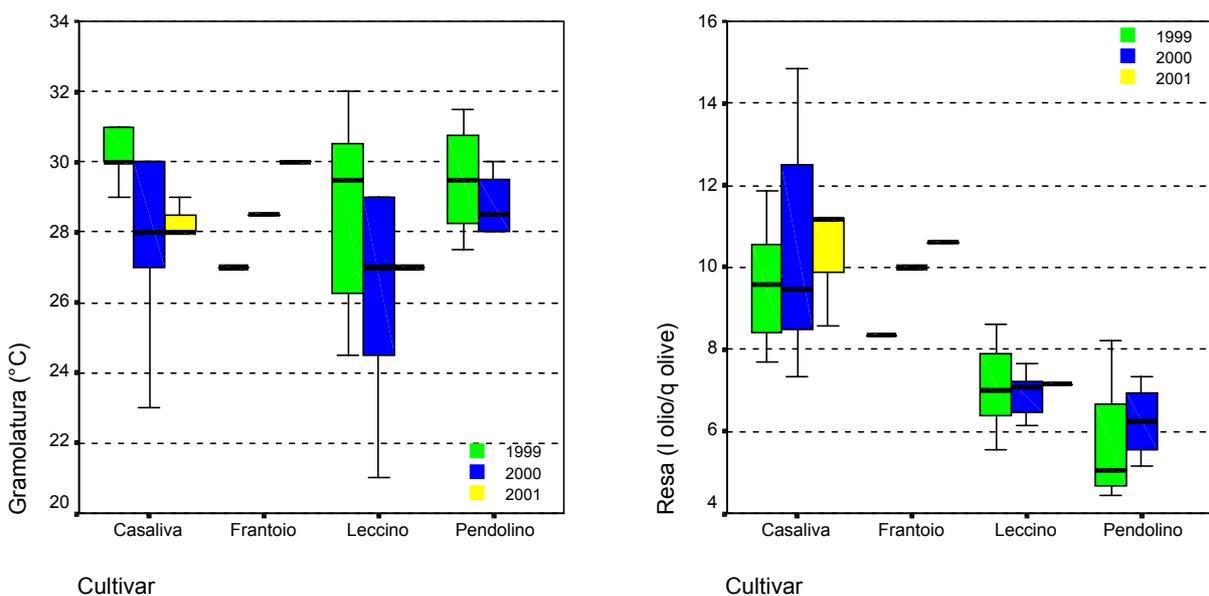
La figura 8 mostra gli indici di lavorazione delle olive usate per ottenere gli oli per la caratterizzazione chemiometrica: la temperatura della pasta gramolata è stata mantenuta tra i 23°C e 35°C con una media di circa 29°C, e la resa media in olio è stata di 9,89 litri per ogni 100 kg di olive, con un minimo di 4,96 l/q per Pendolino ed un massimo di 15,16 l/q per Trepp.

Figura 8 – Olive utilizzate per la caratterizzazione chemiometrica degli oli: indici di lavorazione.



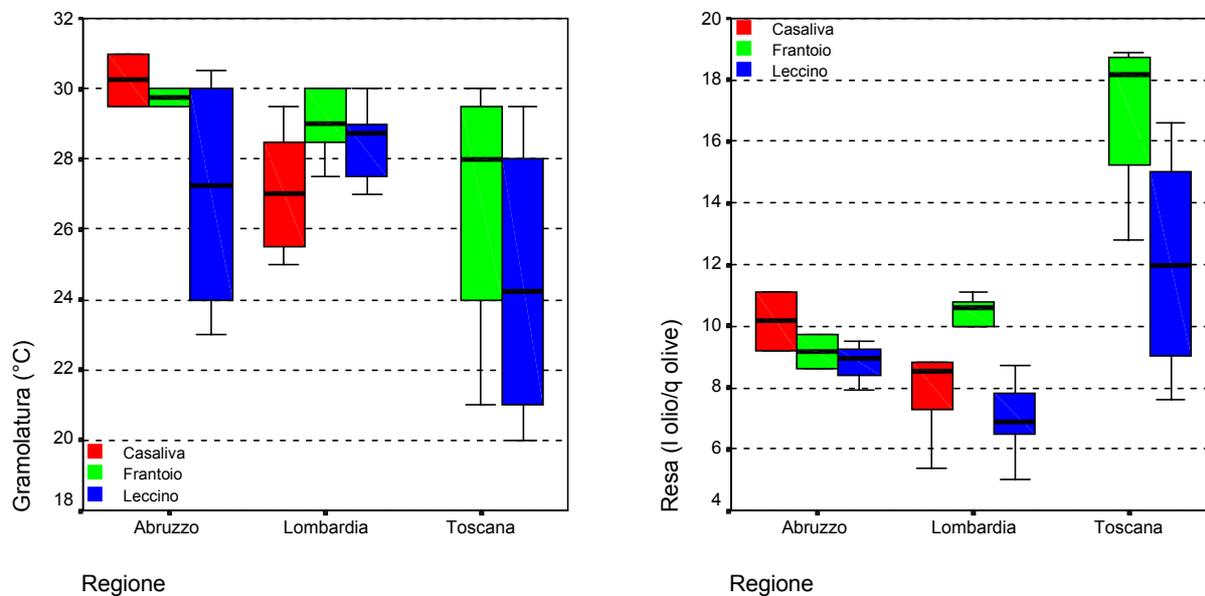
La figura 9 mostra gli indici di lavorazione delle olive raccolte nell'area gardesana: questi evidenziano che non vi sono stati danni da innalzamento eccessivo della temperatura durante la gramolazione, che si è mantenuta sotto i 32°C; e la resa in olio è stata maggiore per le cultivar Casaliva e Frantoio, circa 8-12 l/q, e più bassa per Leccino e Pendolino, circa 4-8 l/q.

Figura 9 – Olive utilizzate per le influenze nell'area gardesana degli oli: indici di lavorazione.



La figura 10 mostra gli indici di lavorazione al micro-oleificio delle olive raccolte nelle tre regioni italiane: la temperatura di gramolazione si è mantenuta tra i 20°C ed i 31°C, mentre la resa in olio ha mostrato una differenza notevole tra i campioni abruzzesi (circa 10,1l/q per Casaliva, 9,1l/q per Frantoio e 8,8l/q per Leccino) e lombardi (circa 8,7l/q per Casaliva, 10,6l/q per Frantoio e 7,0l/q per Leccino) rispetto ai toscani (circa 18,1l/q per Frantoio e 12,0l/q per Leccino).

Figura 10 – Olive utilizzate per le influenze regionali in Italia degli oli: indici di lavorazione.



3.3 – ENZIMOLOGIA DELLA LIPOSSIGENASI ED IDROSSIDO LIASI

La metodologia di estrazione e di dosaggio utilizzato per studiare gli enzimi responsabili della via della lipossigenasi è descritta da Olias *et al.* (1993). Essa è stata successivamente rivista e migliorata da Salas (1998) durante la sua ricerca di dottorato su “La via della lipossigenasi nell’oliva” svolta presso l’“Istituto de la Grasa” del CSIC di Siviglia (Spagna).

3.3.1 – Estrazione degli enzimi dalle olive

Gli enzimi lipossigenasi (LOX) ed idroperossido liasi (HPL) sono stati estratti (figura 11) partendo da 10g di polpa di olive a cui vengono aggiunti 2g di polivinilpolipirrolidone (PVPP), che servono ad eliminare i polifenoli, e 30ml di tampone fosfato (100mM fosfato di sodio a pH 6,8 + 0,2mM EDTA + 0,3mM DTT + 10mM S₂O₅Na₂). Il preparato è stato omogenizzato per 1 minuto per 3 volte, tenendo il contenitore nel ghiaccio, filtrato con 2 strati di garza e centrifugato a 15000rpm per 20 minuti a 0°C per separare il surnatante 1, contenente la LOX, dal pellet 1, contenente altri enzimi. Al pellet 1 sono stati aggiunti 30ml di tampone fosfato, e di nuovo la soluzione è stata omogenizzata e centrifugata, come sopra, ottenendo il surnatante 2, scartato, ed il pellet 2, contenente l’HPL ancora da purificare. Al pellet 2 sono stati aggiunti 20ml di tampone fosfato con triton (100mM fosfato di sodio a pH 6,8 + 0,2mM EDTA + 0,3mM DTT + 10mM S₂O₅Na₂ + 0,1% triton x-100), che serve per staccare l’enzima dalla membrana: il tutto è stato omogenizzato, filtrato sottovuoto ed infine centrifugato per separare il surnatante 3, contenente l’HPL, dal pellet 3, scartato.

Dai surnatanti 1 e 3 vengono prelevate aliquote di 1ml, che vengono centrifugate a 13000rpm per 10 minuti a 4°C, per il dosaggio dell’attività enzimatica.

Figura 11 – Metodologia per l’estrazione degli enzimi LOX e HPL dalla pasta di olive.



3.3.2 – Dosaggio enzimatico

Il dosaggio degli enzimi LOX e HPL è stato effettuato allo spettrofotometro (Beckman DU 640), con una scansione per 40 secondi alla lunghezza d'onda di 234nm, con la quale viene letta la variazione di assorbanza degli acidi idroperossidici. Per la lipossigenasi, che ossida gli acidi linoleico e linolenico a 9- e 13-idroperossidi, l'assorbanza aumenta nel tempo, in quanto viene misurato il suo prodotto; mentre per l'idroperossido liasi, che trasforma gli acidi 13-idroperossidici ad aldeidi (esanele, *cis*-3-esanele e *trans*-2-esanele), l'assorbanza diminuisce nel tempo, perché viene dosato il suo reagente.

Il dosaggio della lipossigenasi è stato effettuato mettendo in una cuvetta di quarzo (1cm cammino ottico e 3ml volume) 1,5ml tampone fosfato (0,1M fosfato di sodio a pH 6) + 5µl di surnatante 1 (estratto enzimatico della LOX), per la lettura del bianco; si aggiungono poi 10µl di substrato LA (10mM acido linoleico) e si misura la variazione di assorbanza in 30 secondi. La reazione è la seguente:



Il dosaggio dell'idroperossido liasi è stato effettuato mettendo in una cuvetta di quarzo 1,5ml tampone fosfato (come sopra) + 5µl di surnatante 3 (estratto enzimatico della HPL), per la lettura del bianco; dopo si aggiungono poi 8µl di substrato LNA-OOH (6,13mM acido 13-idroperossilinoilenico) e si misura la variazione di assorbanza in 30 secondi. La reazione è la seguente:



3.3.3 – Preparazione dei substrati

Il substrato LA (10mM acido linoleico) è stato preparato come segue: 10mg di acido linoleico in un matraccio da 25ml + 2,5ml H₂O deionizzata e deossigenata, + 90µl tween-20 + 140µl NaOH 2N, solubilizzare e portare a volume con H₂O; suddividere in aliquote da 2,5ml nelle provette e conservare a -25°C.

Il substrato LNA-OOH (circa 6,13mM acido idroperossilinoilenico) è stato preparato in diversi passaggi. Reazione di formazione dell'LNA-OOH: 10mg acido linolenico + 4mg lipossigenasi commerciale di semi di soia + 100ml buffer borato ossigenato 0,2M pH 9, incubazione a 2°C per 15-30 minuti con flusso costante di O₂; la reazione si è ritenuta conclusa quando la lettura allo spettrofotometro a 234nm dell'LNA-OOH era costante, quindi è stato aggiunto alla soluzione HCl 2N fino ad arrivare a pH 1,5. Estrazione dell'LNA-OOH: attivazione di una micro-colonna in fase inversa C₁₈ Sep-Pak (Waters) con 10ml metanolo e lavaggio con 30ml tampone borato ossigenato 0,2M pH 9; caricamento in colonna della soluzione, lavaggio con H₂O ed esano, ed eluizione dell'LNA-OOH con 2ml metanolo. Determinazione della purezza dell'estratto (Sanz *et al.*, 1993): metilazione con 1,5ml dietil etere + 1,5ml 2-(2-dietossi)-etanolo + 300mg NTSA (*n*-metil-*n*-nitroso-*p*-toluenesulfon-ammide) + 3ml KOH 60%, estrazione dei gas formati mediante trascinalamento con N₂ fino a quando il colore giallo era persistente; la purezza è stata controllata mediante HPLC con una colonna LiChrosorb Si-60 (lunghezza 250mmn, diametro 4mm, spessore del film 5µm – Merk), fase mobile *n*-esano:dietil etere (92:8), flusso 1,25ml/min e rivelatore UV a 234nm, il cromatogramma presentava un picco grande appartenente al 13-*cis*-LNA-OOH e tre piccoli associati agli isomeri 13-*trans* e 9-*cis* e 9-*trans*. Determinazione della concentrazione: sono state effettuate letture allo spettrofotometro a 234nm di diverse diluizioni dell'estratto e, in base alla legge di Lamber-Beer $[C = \sum(A_i * \epsilon^{-1} * l^{-1}) / n]$ è stata calcolata la

concentrazione media (A_i sono le assorbanze delle diverse diluizioni, $\epsilon=25\text{mM}^{-1}$, l è il cammino ottico della cuvetta e n sono il numero di diluizioni fatte); infine è stato diluito l'estratto alla concentrazione desiderata (circa 5-10mM) e suddiviso in aliquote da 2,5ml nelle provette e conservato in congelatore a -25°C .

3.3.4 – Attività enzimatica

L'attività enzimatica è espressa in unità (U), data dalla quantità di prodotto formato (per la LOX) o di reagente consumato (per la HPL), in un minuto.

La concentrazione dei prodotti formati o dei reagenti consumati è determinata dalla legge di Lambert Beer, $[C (\mu\text{moli/ml}) = A \cdot \epsilon^{-1} \cdot l^{-1} \cdot (V_{t.c.}/V_e)]$, dove A è l'assorbanza, $\epsilon=25\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, l è il cammino ottico, $V_{t.c.}$ è il volume totale nella cuvetta, e V_e è il volume dell'estratto enzimatico]; da questa si ricava l'attività enzimatica $[U (\text{mM/min}) = \Delta A_{30\text{sec}} \cdot 2 \cdot \epsilon^{-1} \cdot l^{-1} \cdot (V_{t.c.}/V_e)]$, in cui $\Delta A_{30\text{sec}}$ è la variazione di assorbanza in 30 secondi]; infine è stata calcolata l'attività enzimatica totale su peso di polpa di olive essiccata ($U_{\text{TOT}} = U \cdot V_{t.e.}/M_{s.s.}$, dove $V_{t.e.}$ è il volume totale dell'estratto enzimatico, e $M_{s.s.}$ è il peso secco della polpa di olive).

In conclusione le attività enzimatiche sono state calcolate come segue:

$$\text{Attività LOX (U / g s.s.)} = (A_{40\text{sec}} - A_{10\text{sec}}) \cdot 2 \cdot \epsilon^{-1} \cdot l^{-1} \cdot (V_{t.c.}/V_e) \cdot V_{t.e.}/M_{s.s.}$$

$$\text{Attività HPL (U / g s.s.)} = (A_{10\text{sec}} - A_{40\text{sec}}) \cdot 2 \cdot \epsilon^{-1} \cdot l^{-1} \cdot (V_{t.c.}/V_e) \cdot V_{t.e.}/M_{s.s.}$$

in cui $A_{10\text{sec}}$ e $A_{40\text{sec}}$ sono le assorbanze lette a 10 secondi ed a 40 secondi dalla scansione.

3.4 – DETERMINAZIONI ANALITICHE SUGLI OLI MONOVARIETALI

Le analisi chemiometriche eseguite sugli oli monovarietali sono state condotte seguendo i metodi riportati nel regolamento CE 2568/91 (e sue modifiche) ed adattando le metodologie riportate nei lavori in letteratura.

3.4.1 – Determinazione dell'acidità

La determinazione è stata effettuata seguendo la metodologia riportata nell'allegato II del reg. CE 2568/91. Un aliquota di olio (5g) viene solubilizzata con 50ml della miscela etanolo:etere dietilico (1:1), neutralizzata in precedenza con NaOH, e titolata con una soluzione di NaOH 0,01N standardizzata, in presenza di fenoftaleina come indicatore, per determinare il contenuto di acidi grassi liberi.

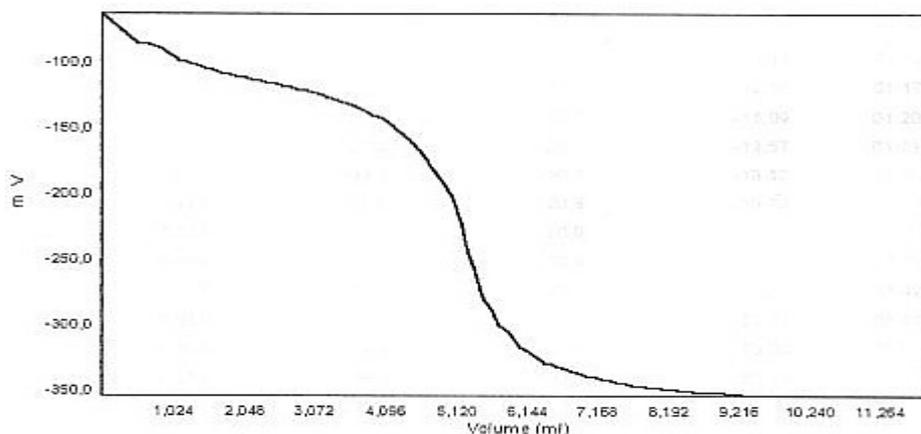
Mantenendo il principio del metodo, la titolazione è stata eseguita con un titolatore automatico (Compact Tritrator – Crison), il quale, dopo aver effettuato la titolazione con NaOH 0,01N, converte la variazione di conduttanza (mV), in funzione del volume di titolazione usato (figura 12), nel valore di acidità libera:

$$\text{Acidità (\% in acido oleico)} = \text{ml NaOH} \cdot \text{N NaOH st.} \cdot 282,45 / (10 \cdot \text{g olio})$$

La standardizzazione di NaOH è stata fatta pesando 50mg di ftalato acido di potassio, aggiungendo 30ml di H₂O e titolando con NaOH, in modo da ricavare la concentrazione esatta:

$$\text{N NaOH st.} = \text{g ftalato} \cdot \text{purezza ftalato} \cdot 1000 / (\text{PE ftalato} \cdot \text{ml NaOH})$$

Figura 12 – Tracciato della determinazione dell'acidità con il titolatore automatico.



3.4.2 – Determinazione del numero di perossidi

Il metodo ufficiale (allegato III del reg. CE 2568/91) consiste nel dissolvere un'aliquota di olio (1g) in 25ml della miscela acido acetico:cloroformio (15:10), aggiungere 1ml di soluzione satura di KI, agitare per 1 minuto, lasciare al buio per 5 minuti, aggiungere 75ml di acqua ed infine titolare con una soluzione di Na₂S₂O₃ 0,01N standardizzata aggiungendo la salda d'amido come indicatore.

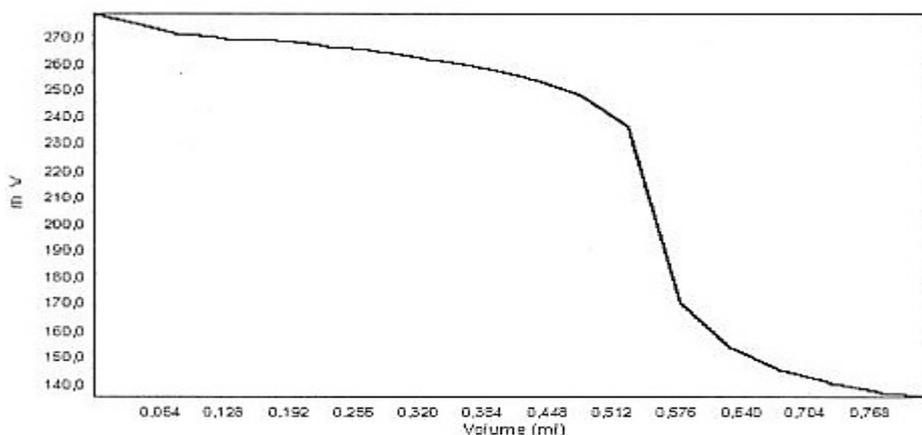
La titolazione è stata eseguita con il titolatore automatico (Compact Tritrator – Crison), mantenendo il principio del metodo, il quale, dopo aver effettuato la titolazione con Na₂S₂O₃ 0,01N, converte la variazione di conduttanza (mV), in funzione del volume di titolazione usato (figura 13), nel valore di numero di perossidi:

$$N^{\circ} \text{ perossidi (meq O}_2\text{/kg olio)} = \text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ st.} \cdot 1000/\text{g olio}$$

La standardizzazione del Na₂S₂O₃ è stata fatta con 20mg di K₂Cr₂O₇ + 0,75g di KI + 1,5ml HCl concentrato, agitando per 1 min, lasciando al buio per 5 minuti, aggiungendo 20ml di H₂O, e titolando con Na₂S₂O₃:

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ st.} = \text{g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{purezza K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 1000 / (\text{PE K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$$

Figura 13 – Tracciato della determinazione del numero di perossidi con il titolatore automatico.



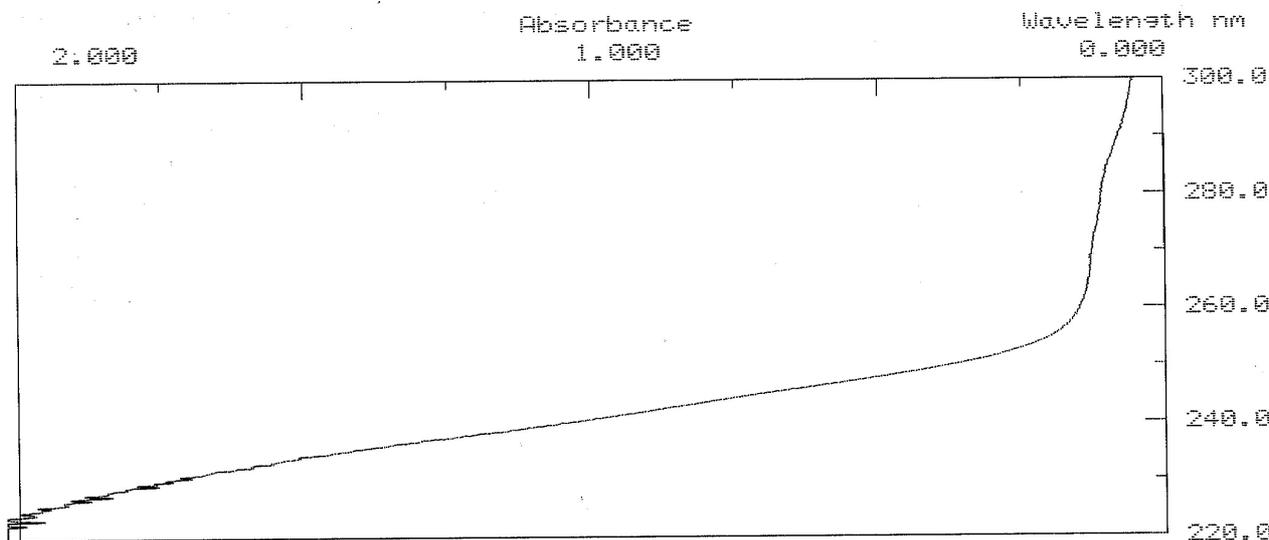
3.4.3 – Analisi spettrofotometrica nell’ultravioletto

Gli indici spettrofotometrici nell’UV sono stati determinati seguendo il metodo riportato nell’allegato IX del regolamento CE 2568/91.

In un matraccio da 10ml è stato pesato 0,1g di olio, solubilizzato con iso-ottano e ottenendo una concentrazione dell’1%. Tale soluzione è stata letta allo spettrofotometro (Modello 7800 con plotter PTL 396 – Jasco), usando il solvente puro come bianco, a 232nm per i dieni, a 270nm per i trieni, ed a 266 e 274nm per la determinazione del ΔK (figura 14).

I valori sono espressi come estinzione specifica K₂₃₂ e K₂₇₀, e come $\Delta K = |K_{270} - (K_{266} + K_{274})/2|$.

Figura 14 – Spettro di assorbimento nell’UV di un campione di olio alle lunghezze d’onda tra 220-300nm.



3.4.4 – Determinazione degli acidi grassi

Per determinare la composizione degli acidi grassi di un olio, sia liberi che legati, occorre idrolizzare quelli legati, renderli volatili mediante una derivatizzazione di esterificazione ed infine analizzarli per gas-cromatografia, come descritto negli allegati XA e XB del regolamento CE 2568/91.

Preparazione degli esteri metilici: si pesano 0,3g di olio in una provetta da 10ml a collo smeriglio, si aggiungono 5ml di esano + 0,3ml della soluzione satura di KOH 2N in metanolo, si agita per 1 minuto, si centrifuga per 5 minuti a 3000rpm, si prelevano 2 gocce di surnatante e si diluiscono in 1ml di esano.

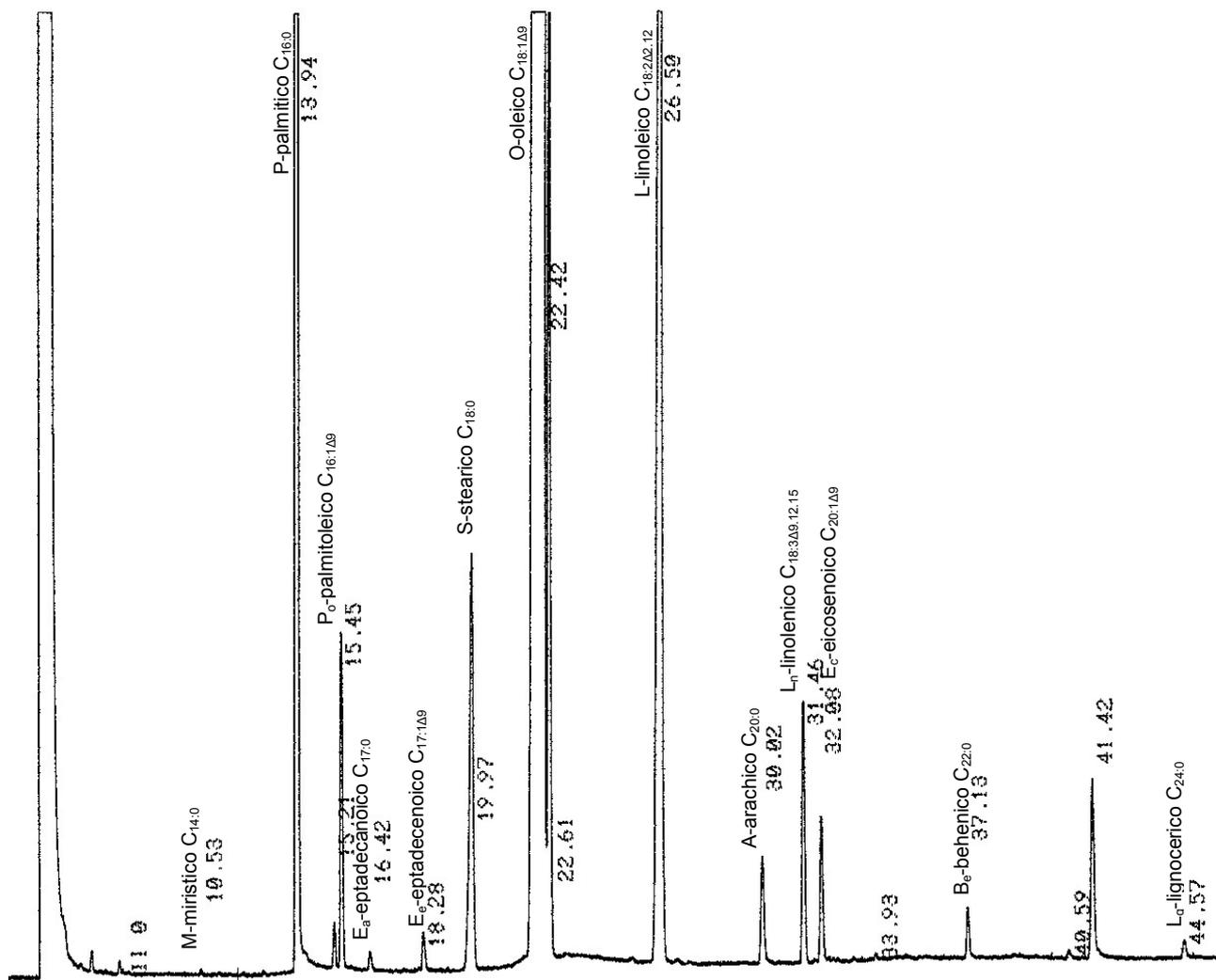
Analisi gas-cromatografica: si iniettano “on column” 0,5µl della soluzione nel GC (HRGC MEGA serie 8560 – Carlo Erba) con colonna capillare SP-2380 (60m x 0,32mm, 0,2µm – Supelco), si effettua la separazione con una temperatura programmata (120°C per 0min, incremento di 30°C/min fino a 165°C per 25min, incremento di 7°C/min fino a 200°C per 15min, incremento di 7°C/min fino a 230°C per 15 min) usando l'idrogeno come carrier ad una pressione di 50kPa, ed infine si rivelano i picchi con un detector ad ionizzazione di fiamma (FID) alla temperatura di 250°C.

La figura 15 mostra un cromatogramma di riferimento, con gli acidi grassi separati ed identificati.

I risultati sono espressi in percento dell'area del picco in esame (A_i) sull'area totale dei picchi acidi (A_{tot}).

$$\% \text{ acido grasso} = A_i \cdot 100 / A_{tot}$$

Figura 15 – Cromatogramma GC-FID di riferimento con gli acidi grassi separati ed identificati.



3.4.5. – Determinazione dei trigliceridi

La composizione trigliceridica è stata eseguita seguendo il metodo riportato in allegato VIII del regolamento CE 2568/91, aggiustato in base a lavori riportati in letteratura (Gigliotti *et al.*, 1993a; Marini *et al.*, 1989).

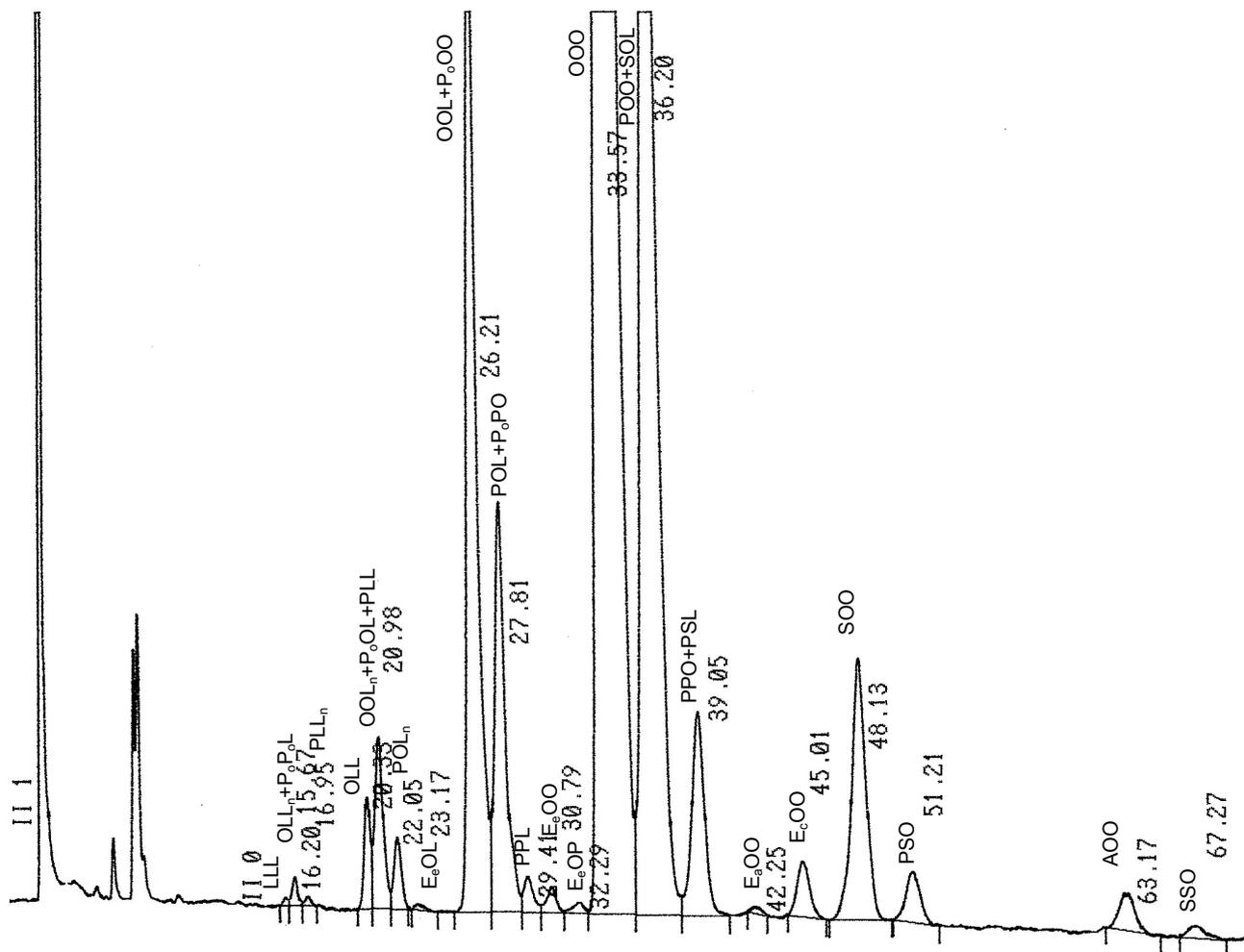
Un'aliquota di olio (0,5g) è disciolta con acetone in un matraccio da 10ml, la soluzione viene filtrata (diametro 25mm, porosità 0,2µm in PTFE, – Whatman) e 10µl della stessa è iniettata in HPLC (CM 3000 – Milton Roy). La separazione dei trigliceridi è avvenuta usando una colonna Supelcosil LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm – Supelco) termostata a 20°C, con una fase mobile di acetonitrile:acetone (40:60) in eluizione isocratica ad un flusso di 0,8ml/min. I picchi eluiti sono rivelati da un detector ad indice di rifrazione (rifrattometro IR – Milton Roy). I trigliceridi si separano in base al loro peso molecolare ed al loro grado di insaturazione.

La figura 16 indica un cromatogramma esemplificativo.

Il metodo CE prevede che i trigliceridi vengano espressi come numero di atomi di carbonio equivalenti (ECN), dato dal numero totale di atomi di carbonio (CN) meno 2 volte il numero totale di doppi legami (n), $ECN = CN - 2 * n$, ma in questa ricerca sono stati espressi in percento dell'area del picco in esame (A_i) sull'area totale dei picchi trigliceridici (A_{tot}).

$$\% \text{ trigliceride} = A_i * 100 / A_{tot}$$

Figura 16 – Cromatogramma HPLC-rifrattometro di riferimento con i trigliceridi separati ed identificati.



3.4.6 – Determinazione degli alcoli alifatici e triterpenici, e degli steroli

Il regolamento CE 2568/91 negli allegati IV, V e VI, ed Amelotti (1990) descrivono le metodiche per determinare gli alcoli alifatici e triterpenici, gli steroli, ed i dialcoli triterpenici (eritrodiole ed uvaolo).

Estrazione della frazione insaponificabile: un'aliquota di olio (5g), addizionata di 250µl di 1-eicosanolo 0,1% (Sigma) in cloroformio (standard interno per gli alcoli) e di 500µl di α-colestanolo 0,2% (Sigma) in cloroformio (standard interno per gli steroli), è saponificata con 50ml di KOH 2N in soluzione etanolica riscaldando a ricadere per 30 minuti; vengono recuperati i vapori nella refrigerante con 50ml di H₂O, si aggiungono altri 50ml di H₂O e l'insaponificabile viene estratto con 3 lavaggi di etere etilico (70ml per volta) e successivamente pulito con lavaggi di H₂O (50ml per volta) fino alla neutralizzazione dell'estratto (scarto incolore alla fenoftaleina); la fase eterea (insaponificabile) viene recuperata in un pallone con Na₂SO₄ anidro, filtrata e passata al rotavapor per evaporare il solvente, infine il residuo viene ripreso con 2ml di cloroformio.

Separazione degli alcoli e steroli: 240µl del residuo solubilizzato viene deposto su una lastra in gel di silice 60G per TLC (20cm x 20cm, 5µm) e fatta correre in una vasca di eluizione con 200ml di una miscela esano:etere (65:35) fino a 1cm dal fronte; viene fatta evaporare la fase mobile e le bande vengono rivelate con il 2,7-diclorofluoresceina 0,2% in soluzione etanolica basica osservate alla luce U.V.; la lastra presenta 4 bande, le prime 2, in ordine di eluizione, appartengono ai dialcoli triterpenici (eritrodiole ed uvaolo) ed agli steroli, le successive agli alcoli alifatici e triterpenici; si recuperano gli steroli+dialcoli e gli alcoli raschiando separatamente le bande e solubilizzandole con etere dietilico; si filtrano le soluzioni e si fa evaporare il solvente in corrente di azoto fino ad essiccazione; il residuo viene aggiunto di 80µl di una soluzione silanzante di piridina:esametildisilazano:trimetilclorosilano (9:3:1), si agitare e dopo 30 min si inietta al GC.

Analisi GC per la determinazione degli alcoli: si iniettano "in split" (rapporto di splittaggio: top 3ml/min e bottom 60ml/min) a 280°C 1,2µl della soluzione nel GC (HRGC MEGA serie 5160 – Carlo Erba) con colonna capillare AT-5 (30m x 0,32mm, 0,25µm – Alltech), si effettua la separazione con una temperatura programmata (180°C per 5min, incremento di 5°C/min fino a 265°C per 30min) usando l'idrogeno come carrier ad una pressione di 60kPa ed infine si rivelano i picchi con un detector ad ionizzazione di fiamma (FID) alla temperatura di 290°C. La figura 17 mostra un cromatogramma di riferimento, con gli alcoli alifatici e triterpenici separati. I risultati sono espressi in mg 1-eicosanolo/kg olio (ppm), in cui A_a è l'area dell'alcol, M_{st} sono i mg di standard aggiunti, A_{at} è l'area dello standard, e M_{olio} sono i g di olio usati:

$$\text{Alcol (ppm)} = (A_a * M_{st} * 1000) / (A_{at} * M_{olio})$$

$$\text{Alcoli totali (ppm)} = \sum \text{alcoli (ppm)}$$

Analisi GC per la determinazione degli steroli: si inietta "in split" (rapporto di splittaggio: top 3ml/min e bottom 60ml/min) a 280°C 1,2µl della soluzione nel GC (HRGC MEGA serie 5160 – Carlo Erba) con colonna capillare Phenomenex ZB-5 (30m x 0,32mm, 0,10µm – Zebron), si effettua la separazione con una isoterma a 265°C usando l'idrogeno come carrier ad una pressione di 40kPa ed infine si rivelano i picchi con un detector ad ionizzazione di fiamma (FID) alla temperatura di 290°C. La figura 18 mostra un cromatogramma di riferimento, con gli steroli ed i dialcoli triterpenici separati. I risultati sono espressi come: % dell'area del picco (A_i) sull'area totale dei picchi sterolici (A_{tot}), per gli steroli singoli; mg α-colestanolo/kg olio (ppm), per gli steroli totali (in cui M_{st} sono i mg di standard, A_{at} è l'area dello standard e M_{olio} sono i g di olio); infine, in % dell'area dei picchi dell'eritrodiole (A_e) e dell'uvaolo (A_u) sull'area totale dei picchi sterolici (A_{tot}) e dialcolici.

$$\% \text{ sterolo} = A_i * 100 / A_{tot}$$

$$\text{Steroli (ppm)} = (A_{tot} * M_{st} * 1000) / (A_{at} * M_{olio})$$

$$\% \text{ dialcoli} = (A_e + A_u) * 100 / (A_{tot} + A_e + A_u)$$

Figura 17 – Cromatogramma GC-FID di riferimento con gli alcoli alifatici e triterpenici separati ed identificati.

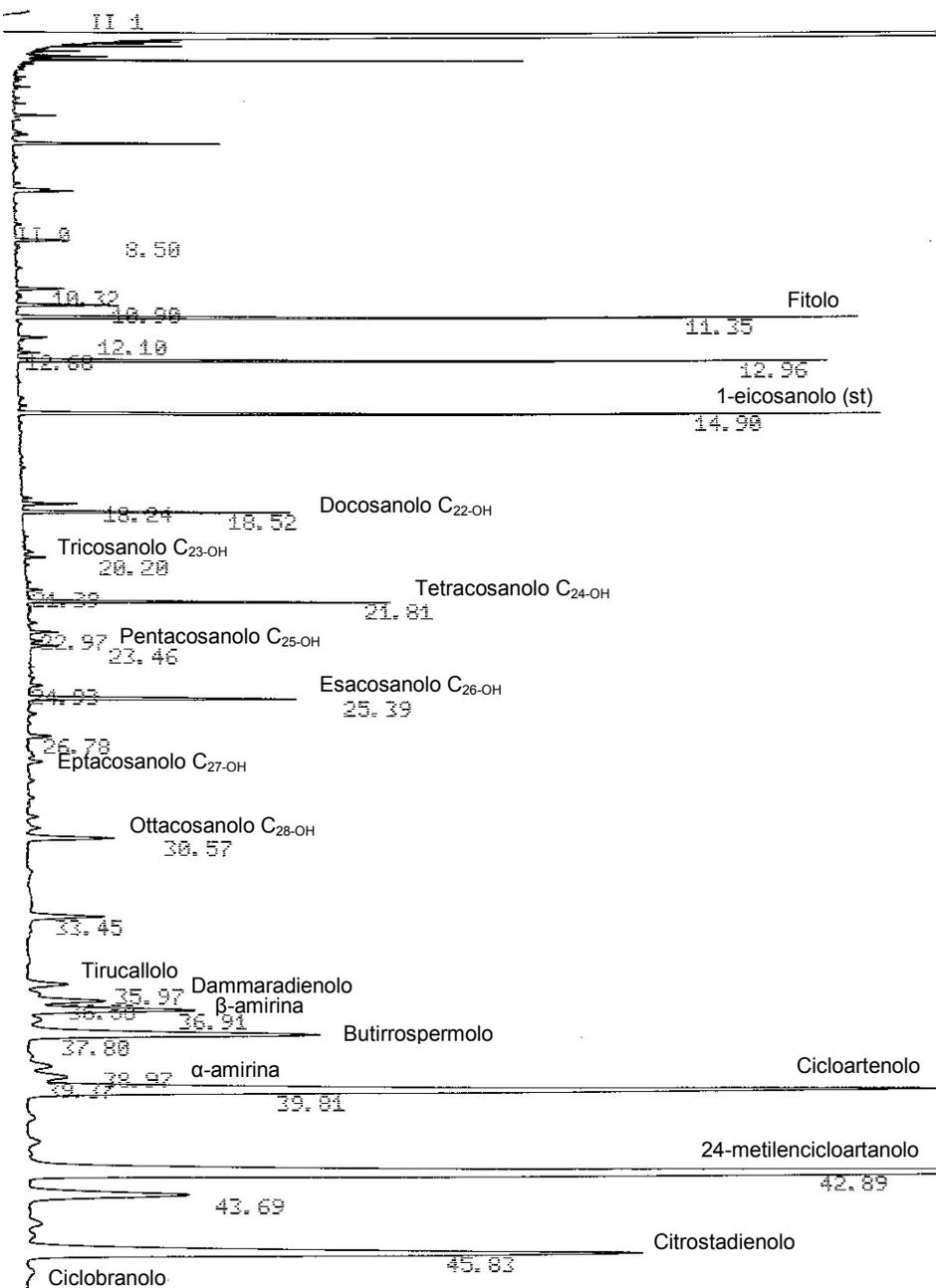
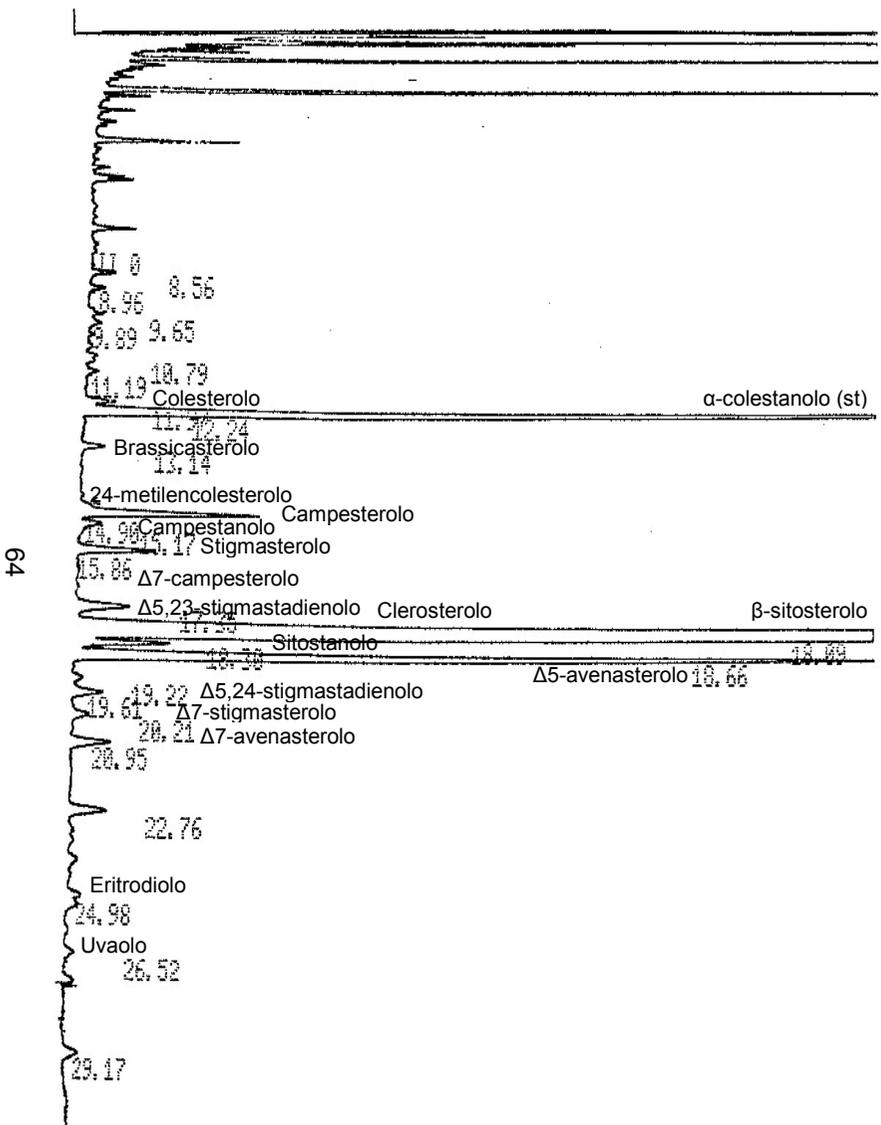


Figura 18 – Cromatogramma GC-FID di riferimento con gli steroli ed i diacoli separati ed identificati.



3.4.7 – Determinazione dei polifenoli

La determinazione dei polifenoli è stata rivista e messa a punto in base alle esperienze riportate in letteratura (Cortesi *et al.*, 1995a e 1995b; Montedoro *et al.*, 1992a, 1992b e 1993b; Ryan *et al.*, 1999b).

Estrazione: 10g di olio sono pesati in un provettone da centrifuga, vengono aggiunti 5ml di esano + 6,25ml della miscela metanolo:acqua (60:40) + 0,5ml di acido siringico 0,01% (Fluka) in metanolo, come standard interno; si agita per 15 minuti, si centrifuga a 3000rpm per 10 minuti, si separa l'estratto metanolo:acqua, che viene posto in un imbuto separatore da 100ml; la fase esano:olio viene estratta altre 2 volte aggiungendo metanolo:acqua, agitando, centrifugando e separando nelle stesse condizione descritte prima; i tre estratti metanolo:acqua vengono lavati per 2 volte con esano (7,5ml per volta), ed infine si recuperano 10ml dell'estratto, che viene portato a secco in un evaporatore rotante sottovuoto a 35°C e ripreso con 1ml della miscela metanolo acqua prima di essere iniettato in HPLC.

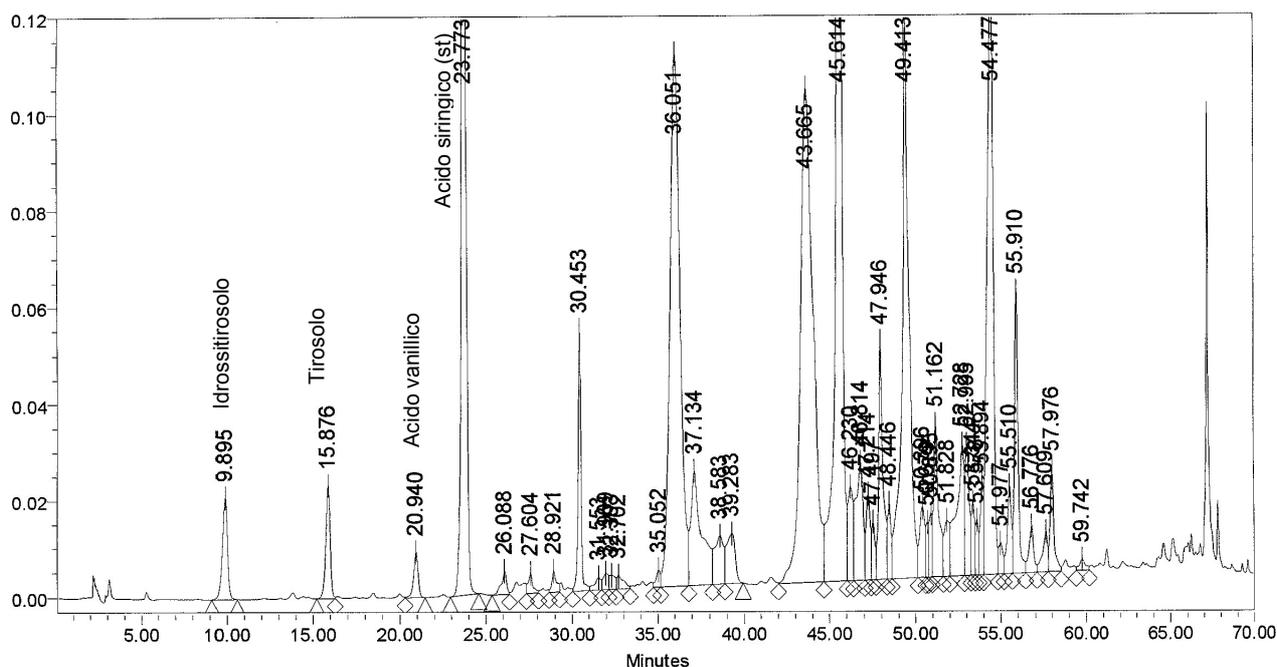
Analisi HPLC: 20µl dell'estratto metanolo:acqua sono iniettati in HPLC (CM 4000 - Milton Roy); la separazione è avvenuta usando una colonna RP-18 in fase inversa (25cm x 4,6mm, 5µm - Spherisorb), con una fase mobile di (A) acetonitrile:metanolo (50:50) e (B) 2% acido acetico in acqua millipore, in gradiente (0min 2% A, 20min 17% A, 25min 30% A, 30min 30% A, 40min 35% A, 45min 52% A, 50min 52% A, 60min 75% A, 63min 100% A, 68min 100% A, 70min 2% A) ad un flusso di 1ml/min; i picchi eluiti sono rivelati un detector a fotiododi (DAD – Waters) alla lunghezza d'onda di 270nm.

La figura 19 mostra un cromatogramma di riferimento, con i polifenoli separati ed identificati, gli altri picchi sono ancora in fase di studio per il riconoscimento. I risultati sono espressi in mg tirosolo/kg olio (ppm), in cui A_f è l'area del fenolo in esame, M_{st} sono i mg di standard aggiunti, $K_{T/S}$ è il fattore di risposta tra tirosolo ed acido siringico, A_{at} è l'area dello standard, M_{olio} sono i g di olio usati e A_{tot} è l'area totale dei picchi polifenolici:

$$\text{Fenolo (ppm)} = (A_f * M_{st} * K_{T/S} * 1000) / (A_{st} * M_{olio})$$

$$\text{Polifenoli totali (ppm)} = (A_{tot} * M_{st} * K_{T/S} * 1000) / (A_{st} * M_{olio})$$

Figura 19 – Cromatogramma HPLC-DAD di riferimento con fenoli separati ed identificati.



3.4.8 – Determinazione dei tocoferoli

Il contenuto in tocoferoli è stato determinato usando il metodo messo a punto partendo da indicazioni bibliografiche (Psomiadou and Tsimidou, 1998).

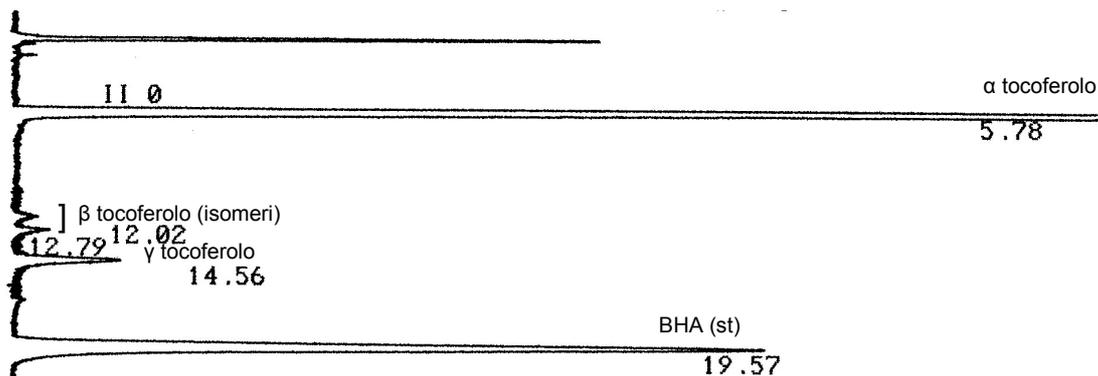
Vengono pesati in un matraccio da 10ml 1,5g di olio, si aggiungono 20µl di BHA 0,2% (Merck) in esano, come standard interno, e si porta a volume con esano:*n*-propanolo (99,2:0,2). La soluzione viene filtrata (diametro 25mm, porosità 0,2µm in PTFE, – Whatman) e 10µl della stessa sono iniettati in HPLC (CM 3000 - Milton Roy). La separazione dei tocoferoli è avvenuta usando una colonna Lichrosorb Si 60 (25cm x 4,6mm, 5µm - Merck), con una fase mobile di esano:*n*-propanolo (99,8:0,2) in eluizione isocratica ad un flusso di 2ml/min. I picchi eluiti sono rivelati uno spettrofluorimetro (1046 A – Helwlett Pakard) con un programma di lunghezze d'onda: 10,30min, λ_{ex} 298nm e λ_{em} 321nm; 17,00min, λ_{ex} 227nm e λ_{em} 314nm.

La figura 20 indica un cromatogramma esemplificativo della separazione ottenuta.

I risultati sono espressi in mg tocoferolo/kg olio (ppm), in cui A_t è l'area del tocoferolo in esame, M_{st} sono i mg di standard aggiunti, K_{v/BHA} è il fattore di risposta tra il tocoferolo ed il BHA, A_{at} è l'area dello standard e M_{olio} sono i g di olio usati:

$$\text{Tocoferolo (ppm)} = (A_t * M_{st} * K_{v/BHA} * 1000) / (A_{at} * M_{olio}) \quad \text{Tocoferoli totali (ppm)} = \sum \text{tocoferoli (ppm)}$$

Figura 20 – Cromatogramma HPLC-spettrofluorimetro di riferimento con i tocoferoli separati ed identificati.

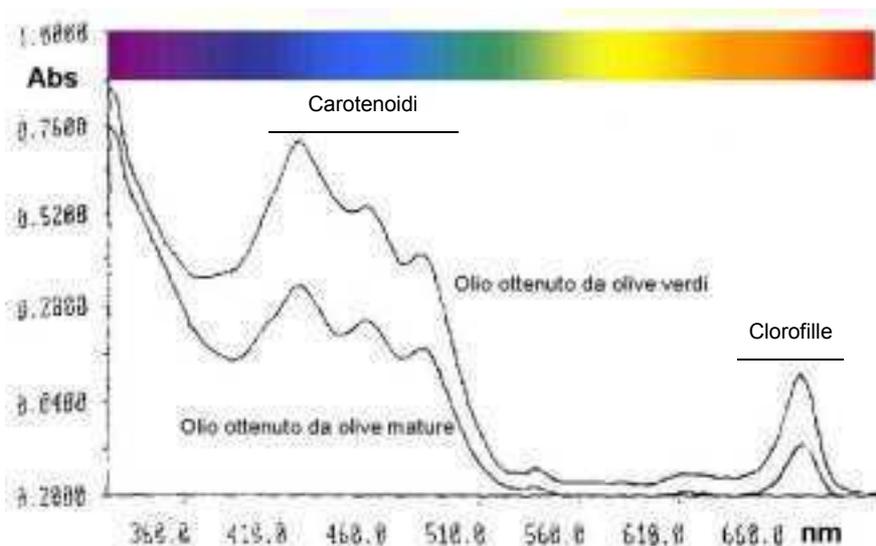


3.4.9 – Determinazione del colore e dei pigmenti: carotenoidi e clorofille

Il colore dell'olio è stato valutato mediante gli indici spettrofotometrici nel visibile, mettendo a punto i metodi rinvenuti in letteratura (Harwood and Aparicio, 2000).

E' stata valutata l'assorbanza con uno spettrofotometro (Modello 7800 con plotter PTL 396 – Jasco) di 1g di olio solubilizzato, in un matraccio da 10ml, con *iso*-ottano, ottenendo una concentrazione del 10%, a caratteristiche lunghezze d'onda: 670nm per la clorofilla; 475, 448, e 414nm per i carotenoidi (figura 21).

Figura 21 – Spettro di assorbanza nel visibile per gli oli ottenuti da frutti verdi e maturi della stessa cultivar.



Le concentrazioni (mg/ml) di carotenoidi e clorofille totali nella soluzione in esame sono state determinate sostituendo i valori delle assorbanze del campione di olio ($K^{10\%}$), alle caratteristiche lunghezze d'onda, nelle rette di taratura di soluzioni di β -carotene (Fluka) e di clorofilla (Carlo Erba), ottenute misurando le assorbanze di diverse concentrazioni note, comprese tra 0,0001-0,005mg/ml, degli stessi standard.

I contenuti totali di carotenoidi e clorofille sono espressi in mg pigmenti/kg olio (ppm), in cui C_{ca} e C_{cl} sono le concentrazioni dei carotenoidi o delle clorofille ottenute dalle rispettive rette di taratura (mg/ml):

$$\text{Carotenoidi totali (ppm)} = C_{ca} \cdot 10 \text{ml} \cdot 1000$$

$$\text{Clorofille totali (ppm)} = C_{cl} \cdot 10 \text{ml} \cdot 1000$$

3.4.10 – Determinazione della stabilità ossidativa

La stabilità degli oli all'irrancidimento autossidativo (AOS) è data dal contenuto totale in antiossidanti.

Una stima della stabilità ossidativa negli oli è valutabile in base alla misura conduttimetrica dei prodotti di decomposizione accelerata dei grassi, secondo il metodo riportato da Aparicio *et al.* (1999) e dalle esperienze effettuate dalla casa costruttrice dell'apparecchiatura Rancimat (Monografia, *Metrohm Italiana*).

Questo metodo consiste nel determinare il tempo di induzione dato dalla variazione di conducibilità dell'acqua nella quale vengono raccolte le sostanze volatili negative generate durante il processo di ossidazione. Si pesano 4g di olio in appositi recipienti di reazione, che vengono posti nel blocco riscaldatore del Rancimat (Modello 679 – Metrohm) ad una temperatura di 120°C; vengono collegati i recipienti di misurazione contenenti 60ml di H_2O , che vengono chiusi con sonde di misura (elettrodi); viene fatta gorgogliare l'aria ad un flusso di 20 l/h e, dopo un "tempo di induzione" in cui l'olio non mostra variazioni, inizia una fase di rapida diffusione nell'acqua dei prodotti volatili di decomposizione sviluppati dall'ossidazione dell'olio (Figure 22). La figura 23 mostra un tracciato relativo a 6 campioni di olio diversi.

I risultati sono espressi in giorni di durata (shelf life) su kg di olio, in cui t_i è il tempo di induzione e M_{olio} sono i g di olio:

$$\text{Stabilità ossidativa (giorni/kg)} = (t_i \cdot 1000) / (M_{olio} \cdot 24)$$

Figura 22 – Dettaglio del Rancimat 679 e grafico relativo alla determinazione del tempo di induzione.

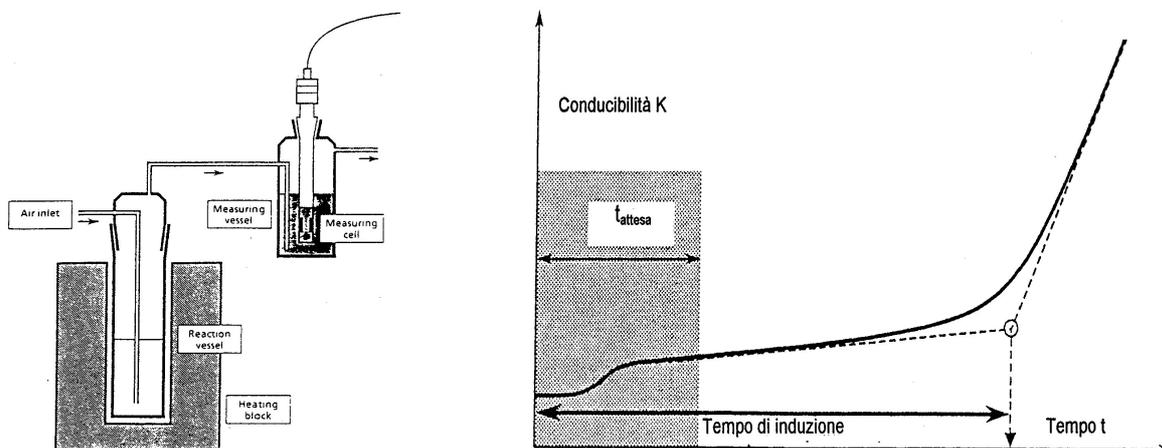
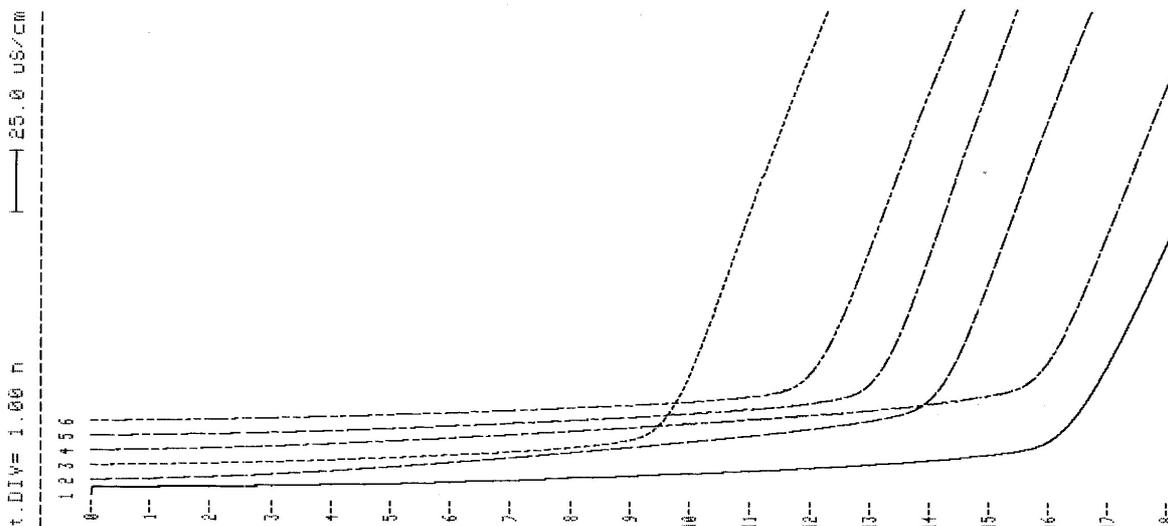


Figura 23 – Tracciato relativo al test del Rancimat di 6 campioni di olio diversi.



Osservazione: la stabilità determinata con il metodo Rancimat non esprime la durata del prodotto nelle condizioni estreme, ma solo valori di raffronto, quindi la conversione per il passaggio dal tempo di induzione al tempo di conservazione, nelle condizioni desiderate, viene determinata dall'esperienza. Questi dati di confronto permettono di conoscere il tempo e le condizioni di conservazione, al fine di garantire un prodotto di qualità al momento del consumo finale, ma non di stabilire la vita commerciale in assoluto.

3.4.11 – Determinazione dei composti volatili nello spazio di testa

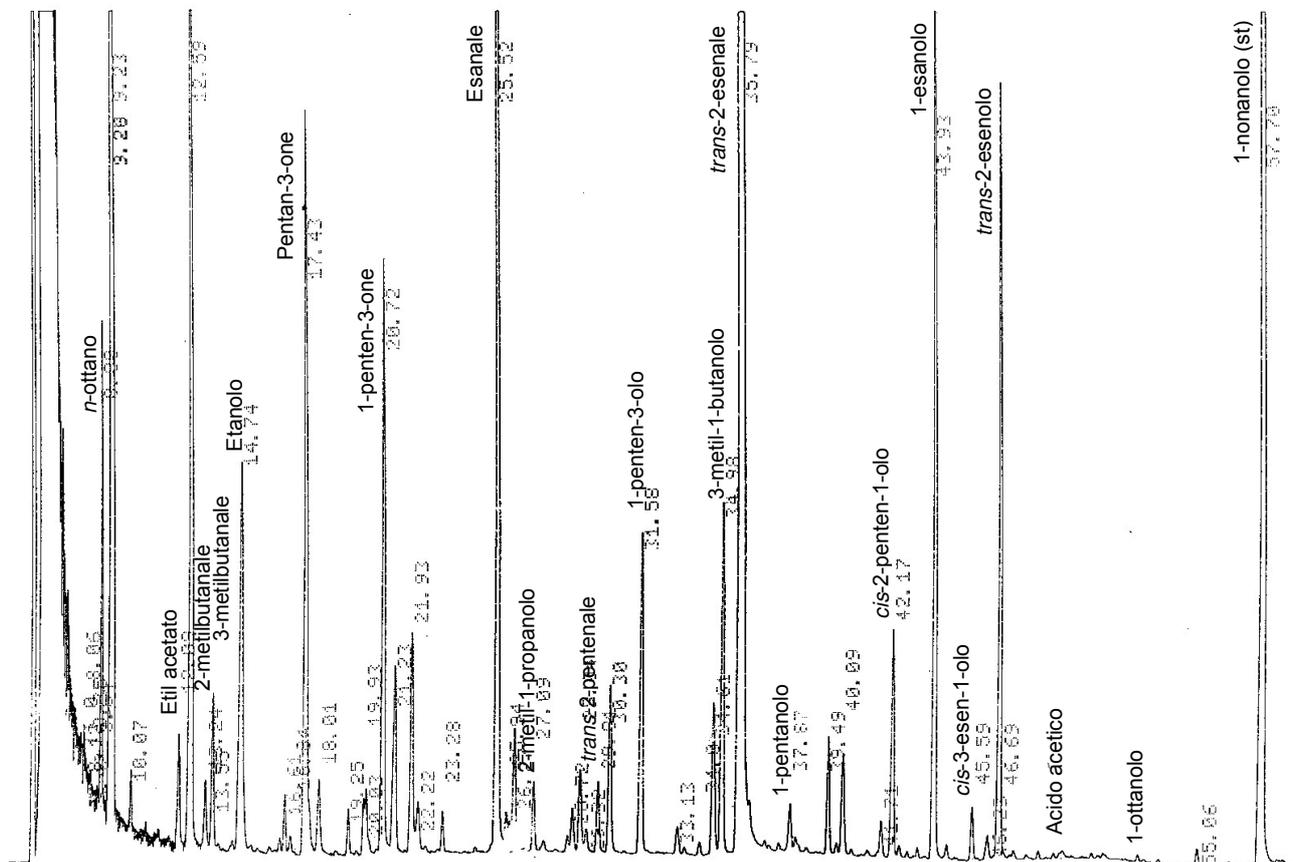
Le sostanze volatili dello spazio di testa sono state determinate per via gas-cromatografica seguendo il metodo riportato da Angerosa *et al.* (1997).

Estrazione dei composti volatili: vengono pesati 50g di olio in appositi contenitori per la determinazione dello spazio di testa della capacità di 100ml; vengono aggiunti 10mg di 1-nonanolo puro (Sigma), quale standard interno; vengono chiusi con coperchi tali da permettere l'ingresso dell'azoto e l'uscita dei composti volatili; viene fatto gorgogliare l'azoto nell'olio ad un flusso di 1,2l/min per 2 ore a 37°C ed i composti volatili vengono trattenuti nelle trappole con 50mg di carbone attivo (0,5-0,85mm, 20-35 mesh – Merck); infine i composti volatili trattenuti dal carbone attivo vengono de-assorbiti e solubilizzati in 1ml di etere dietilico.

Analisi gas-cromatografica: si iniettano "on column" 0,5µl della soluzione nel GC (HRGC MEGA serie 5160 – Carlo Erba) con colonna capillare Supelcowax-10 (60m x 0,32mm, 0,5µm – Supelco), si effettua la separazione con una temperatura programmata (28°C per 6min, incremento di 1°C/min fino a 46°C per 0min, incremento di 4,2°C/min fino a 70°C per 0min, incremento di 3,3°C/min fino a 200°C per 5min) usando l'idrogeno come carrier ad una pressione di 30kPa ed infine si rivelano i picchi con un detector ad ionizzazione di fiamma (FID) alla temperatura di 220°C. La figura 24 mostra un cromatogramma di riferimento, con i composti volatili separati ed identificati. I risultati sono espressi in mg 1-nonanolo/kg olio (ppm), in cui A_v è l'area del composto volatile, M_{st} sono i mg di standard aggiunti, A_{st} è l'area dello standard e M_{olio} sono i g di olio usati:

$$\text{Composto volatile (ppm)} = (A_v * M_{st} * 1000) / (A_{st} * M_{olio}) \quad \text{Aromi totali (ppm)} = \sum \text{composti volatili (ppm)}$$

Figura 24 – Cromatogramma GC-FID di riferimento con i composti volatili separati ed identificati.



3.4.12 – Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale è stata effettuata seguendo la metodica riportata nell'allegato XII del regolamento CE 2568/91 e 1683/92, e modificando opportunamente la scheda indicata nel lavoro di Angerosa *et al.* (1997), in modo da rilevare eventuali caratteristiche tipiche degli oli monovarietali.

Aliquote di circa 15-20ml di olio sono state poste in bicchieri di vetro blu coperti e riscaldati a circa 28-30°C e 4 assaggiatori, ognuno in un ambiente isolato (cabina), ha valutato le percezioni sensoriali dei campioni di olio, innanzitutto valutando la sensazione olfattiva diretta e retronasale, successivamente determinando quella gustativa e tattile, ed infine esprimendo un giudizio globale di gradimento.

La determinazione del profilo sensoriale degli oli analizzati è stata effettuata da tre gruppi di assaggiatori esperti presso l'Istituto Sperimentale per l'Elaiotecnica di Pescara, l'Associazioni Olivicoltori di Savona e la Camera di Commercio di Brescia, utilizzando la scheda parametrica non strutturata riportata nella figura 25.

Figura 25 – Scheda di degustazione parametrica non strutturata utilizzata per il profilo sensoriale.

PROFILO SENSORIALE	
	Min Max
ERBA APPENA TAGLIATA	<input type="text"/>
FOGLIA	<input type="text"/>
FRUTTATO DI OLIVA	<input type="text"/>
FIORI SELVATICI	<input type="text"/>
BANANA VERDE O BUCCIA	<input type="text"/>
POMODORO VERDE	<input type="text"/>
MANDORLA	<input type="text"/>
CARCIOFO	<input type="text"/>
MELA VERDE	<input type="text"/>
BURRO O CREMA DI LATTE	<input type="text"/>
MALLO DI NOCE	<input type="text"/>
FIENO	<input type="text"/>
AMARO	<input type="text"/>
DOLCE	<input type="text"/>
PICCANTE	<input type="text"/>
ALTRO (specificare).....	<input type="text"/>

GRADIMENTO	
	Min Max
	<input type="text"/>

NOME:	DATA:	SIGLA:
-------	-------	--------

3.5 – DETERMINAZIONE DEL PROFILO AROMATICO NEGLI OLI COMMERCIALI

Le sostanze volatili dello spazio di testa dei 40 oli commerciali australiani sono state estratte mediante micro-estrazioni in fase solida. L'analisi dei composti volatili è stata eseguita per via gas-cromatografica con rivelatore ad ionizzazione di fiamma; la quantificazione dei picchi è stata effettuata mediante il metodo dello standard esterno e per la caratterizzazione dei picchi è stato usato il detector a spettrometria di massa.

3.5.1 – Micro-estrazione in fase solida (SPME)

Tenendo conto che la cultivar, i fattori pedo-climatici ed il processo di lavorazione possono tutti influire sulla frazione volatile, è stato sviluppato un metodo per osservare una vasta gamma di composti volatili utilizzando la micro-estrazione in fase solida (SPME), applicazione molto diffusa nell'analisi dei composti volatili (Kataoka *et al.*, 2000; Steenson *et al.*, 2002; Yang and Peppard, 1994), ma poco utilizzata per gli oli di oliva (Bentivenga *et al.*, 2001; Servili *et al.*, 2000). L'estrazione delle sostanze volatili mediante micro-estrazioni in fase solida (SPME) è una tecnica relativamente nuova che dà significativi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali di estrazione (Pawliszyn, 1997): può essere usata per numerose applicazioni (analisi dell'ambiente, studi sull'igiene, monitoraggio della qualità, ecc.), è veloce, riproducibile, accurata, semplice da usarsi, non necessita di solventi od eluenti ed è estremamente sensibile. Il processo di estrazione è basato su due passaggi (Martos and Pawliszyn, 1997): ripartizione degli analiti tra la fase stazionaria (fibra) dell'ago e la matrice del campione, de-assorbimento degli estratti concentrati nello strumento di analisi. Nel primo passaggio la fibra di copertura dell'ago (polidimetilsilossano, PDMS) è esposta direttamente nello spazio di testa, quindi le sostanze semi-volatili o volatili vengono assorbite dalla fibra, successivamente le molecole vengono rilasciate nella colonna gas-cromatografica mediante de-assorbimento per il passaggio-lavaggio della fase mobile nello strumento di analisi. Delle varie fibre della SPME, è stata dimostrata l'ampia selettività della fibra in PDMS per un intervallo eterogeneo di composti volatili analizzati (Perera *et al.*, 2002) e, quindi, utilizzata per questo studio.

I campioni di olio (7ml) sono stati messi in "Reactivials" (capacità 10ml – Supelco) e chiusi con un tappo a setto. I contenitori chiusi sono stati posti in un forno termostato a 40°C e dopo aver raggiunto l'equilibrio tra la fase liquida e gassosa, l'ago della siringa SPME (fibra in polidimetilsilossano PDMS 100µm – Supelco) è stato inserito attraverso il setto e la fibra rimane esposta allo spazio di testa per 30 minuti. La fibra è stata poi ritratta, disinserita dal vial, inserita nell'iniettore del gas-cromatografo ed esposta alla temperatura dell'iniettore per il de-assorbimento degli analiti in modalità splitless.

3.5.2 – Gas-cromatografia con rivelatore ad ionizzazione di fiamma (GC-FID)

Le analisi dei composti volatili dello spazio di testa dell'olio estratti mediante SPME sono state condotte usando un gas-cromatografo Varian Star 3400 CX. La temperatura della colonna era programmata come segue: temperatura iniziale di 40°C per 4 minuti, incremento di 5°C/min fino a 200°C con un periodo isothermico finale di 10 minuti. La separazione degli oli commerciali è stata ottenuta con una colonna SE-54 (30m x 0,25mm, 0,25µm) usando l'azoto come carrier ad un flusso di 2 ml/min (pressione di 14psi). Gli oli di laboratorio sono stati separati nelle stesse condizioni usando una colonna Phenomenex ZB-5 (30m x 0,25mm, 0,25µm). L'iniezione è stata eseguita mediante un de-assorbimento nell'iniettore in splitless per 1 minuto a 250°C. Successivamente la fibra è stata lavata in un iniettore separato per 10 minuti alla stessa

temperatura prima di essere ri-usata. Il rivelatore FID è stato mantenuto a 300°C ed i dati sono stati registrati ed analizzati usando il software cromatografico STAR.

La quantificazione dei picchi cromatografici è stata effettuata mediante il metodo dello standard esterno (Kolb and Ettre, 1997) usando i seguenti composti, senza ulteriore purificazione, per determinare i tempi di ritenzione al gas-cromatografo: *trans*-2 esenale (Merck); esanale, etil acetato, *trans*-2-ottenale (Aldrich); ottanale, *n*-alcani da C₈ a C₁₄ (Sigma); ed 1-esanolo (Riedel de Haen). La calibrazione esterna è avvenuta come segue: sono state preparate delle “soluzioni madri” pesando (bilancia di precisione a 5 cifre decimali) una singola goccia di un appropriato standard (circa 2mg) in una massa conosciuta (circa 7g) di olio di oliva deodorato (senza interferenze nei picchi GC); successivamente sono state eseguite delle diluizioni note (tipicamente da 0,3 a 1,5ml) della “soluzione madre” in un ulteriore 7g di olio deodorato; ed infine le curve di calibrazione sono state costruite estraendo i composti volatili standard dalle diluizioni note ed iniettando in GC-FID come descritto sopra.

Nella figura 26 sono rappresentati, a titolo di esempio, i cromatogrammi ottenuti di 3 diversi oli usando GC-FID: “olio n° 10” è rappresentativo dei campioni di olio nei quali il *trans*-2-esenale è il composto volatile dominante; “olio n° 32” è indicativo per quelli in cui in composto dominante è un’altra sostanza; ed infine “olio n° 36” mostra il profilo aromatico di un olio rancido.

I cromatogrammi sono mostrati tra 0,8 e 30,0 minuti ad un’attenuazione costante.

Le concentrazioni sono espresse in mg di esanale su kg di olio (ppm).

3.5.3 – Gas-cromatografia con spettrometro di massa (GC-MS)

I composti volatili sono stati analizzati anche mediante de-assorbimento termico nell’iniettore del gas-cromatografo Varian 3400 CX accoppiato con uno spettrometro di massa a trappola ionica, per la caratterizzazione dei picchi (Adams, 1995), usando le stesse condizioni cromatografiche come descritto per GC-FID.

L’identificazione dei composti volatili è stata basata sulla comparazione dei tempi di ritenzione e degli spettri di massa con quelli degli standard.

E’ stato usato per MS la ionizzazione ad impatto elettronico (EI) con un controllo progressivo automatico (AGC). Il voltaggio moltiplicatore di elettroni era di 1850V, il target AGC era 25000 colpi e il filamento di emissione della corrente era 15µA con l’ampiezza di modulazione assiale a 4,0V. La temperatura della trappola ionica era mantenuta a 250°C e la temperatura del collettore a 60°C. La temperatura della linea di trasferimento interfacciale GC e MS era settata a 250°C. Il tempo di scansione spettrale di massa da 35 a 450 m/z era di 0,8 secondi (usando 2 microscansioni). La massa di sottofondo era settata a 45 m/z.

Come nella figura 26, anche nella figura 27 sono rappresentati, a titolo di esempio, i cromatogrammi ottenuti di 3 diversi oli usando GC-MS (ionizzazione EI a 70eV).

I cromatogrammi degli oli n° 10, 32 e 36 sono mostrati tra 0,8 e 30,0 minuti ad un’attenuazione costante.

Un’importante distinzione dei 2 diversi cromatogrammi si è osservata nell’intensità relativa dei picchi usando i 2 rivelatori, FID e MS, rispecchiando la differente sensibilità per le stesse molecole volatili.

Figura 26 – Cromatogrammi GC-FID rappresentativi di alcuni campioni di olio.

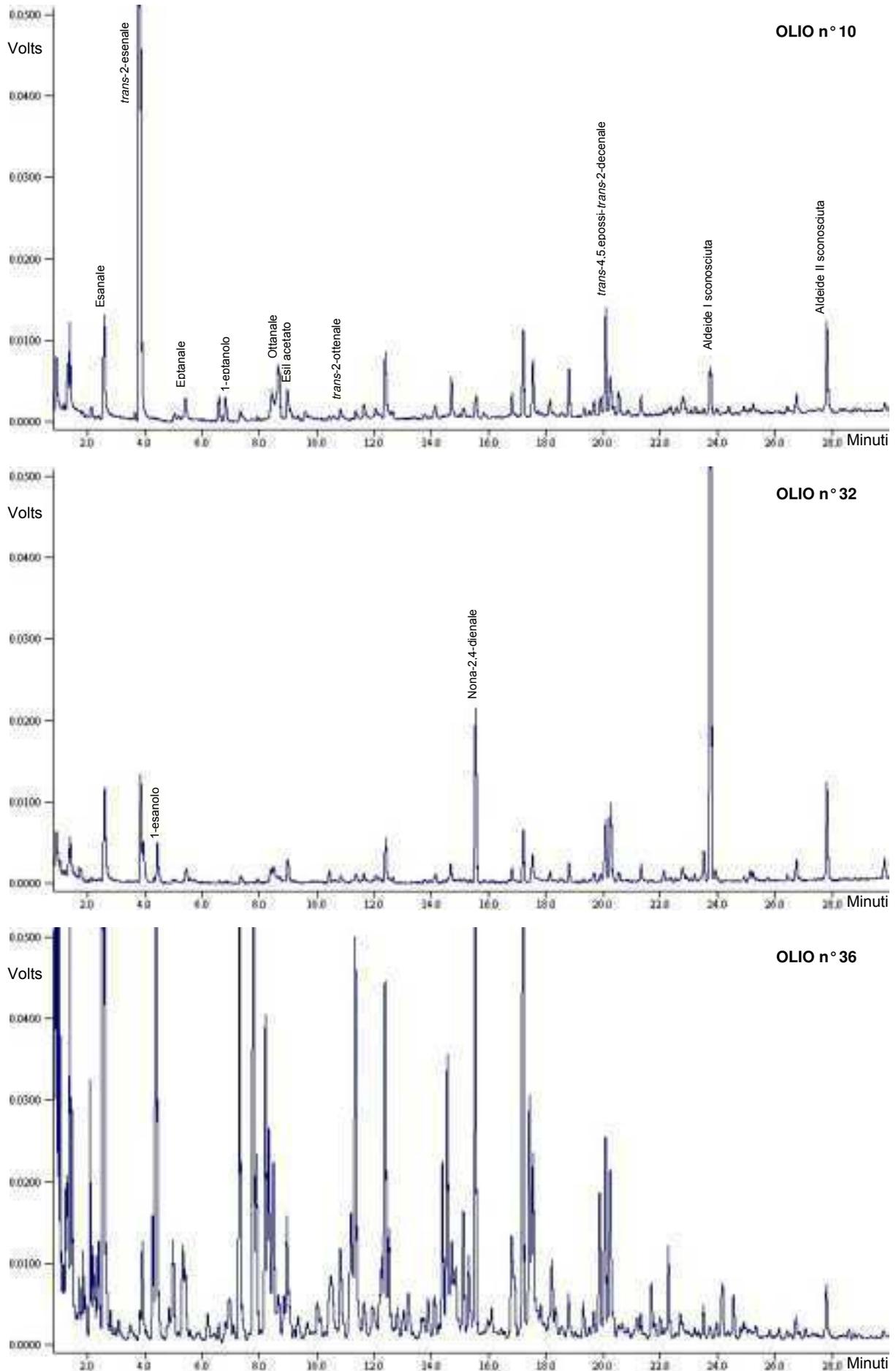
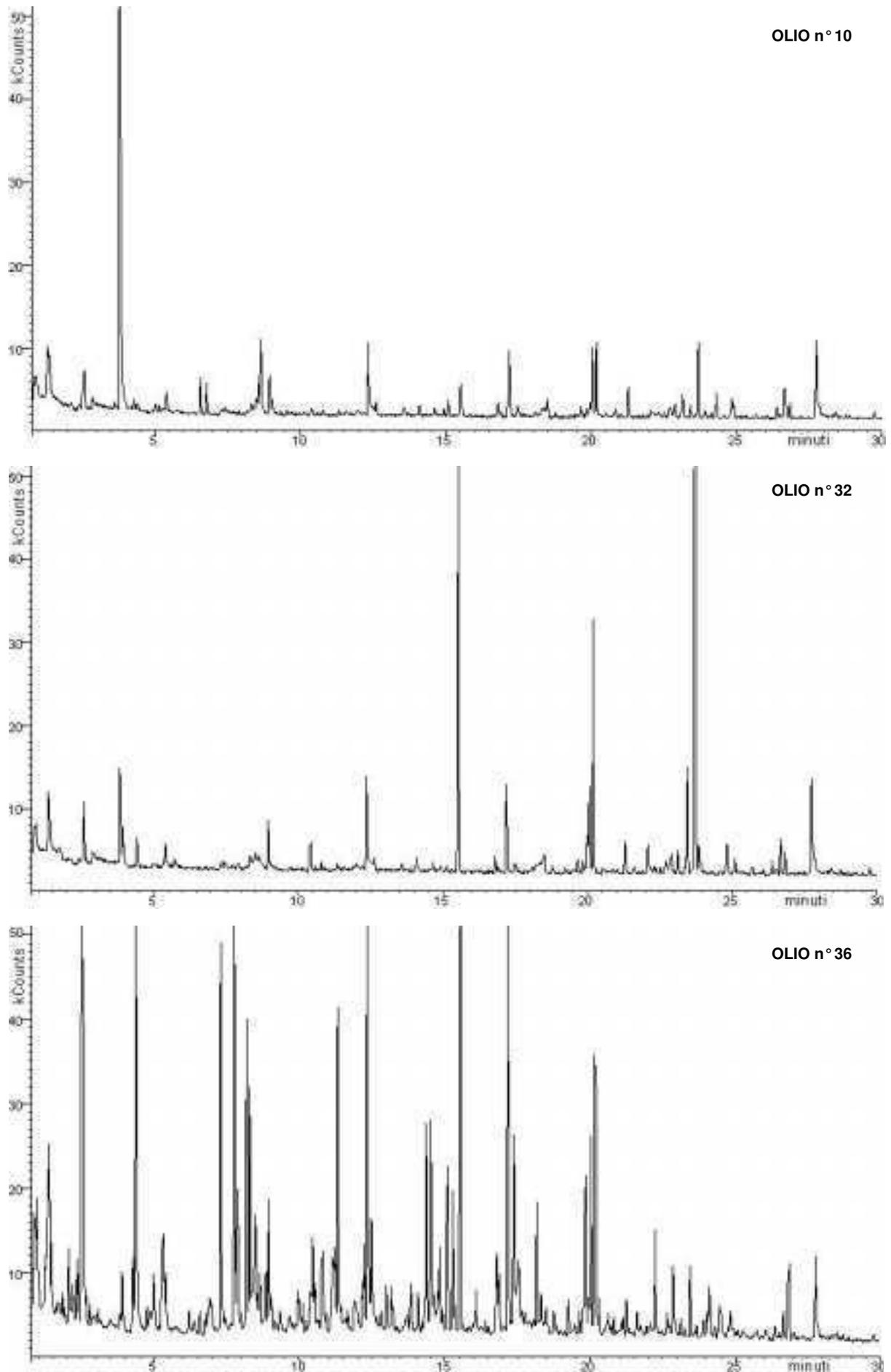


Figura 27 – Cromatogrammi GC-MS (ionizzazione EI a 70eV) rappresentativi di alcuni campioni di olio.



3.6 – ANALISI STATISTICHE

Tutti i dati ottenuti dalle determinazioni analitiche degli oli monovarietali, ai fini della caratterizzazione chemiometrica e dello studio dell'influenza ambientale, e quelli relativi alle determinazioni enzimatiche sono stati sottoposti ad analisi statistica usando il programma SPSS versione 11.5 per windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, 2003).

I risultati, invece, relativi agli oli usati per la caratterizzazione aromatica sono stati elaborati usando il programma statistico S-Plus versione 6.0 per Sun SPARC (MathSoft Inc., 2000).

3.6.1 – Analisi della varianza (ANOVA)

Nell'ANOVA si indica come "fattore sperimentale" la fonte di variabilità che si vuole determinare sulla base dei risultati dell'esperimento; esso può essere presente a più livelli ed ogni livello del fattore viene applicato a più replicazioni. L'analisi della varianza consente quindi di scomporre la varianza di una variabile casuale in componenti indipendenti e relative a due o più livelli di uno o più fattori di variabilità e all'errore sperimentale. I livelli dei fattori di variabilità (la verifica dell'effetto dei quali è lo scopo dell'esperimento) corrispondono a campioni estratti da una popolazione e sono caratterizzati dal valore delle medie campionarie.

Caratterizzazione chemiometrica degli oli

Prima di procedere all'ANOVA si è studiata la distribuzione di ciascuna variabile per verificarne la normalità secondo il test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov ad un livello di significatività del 5%.

Sulle variabili distribuite in modo normale è stata effettuata l'ANOVA valutando l'effetto "cultivar" e "anno" sui livelli delle variabili studiate. Quando l'effetto "accessione" è risultato significativo, per determinare la significatività delle differenze tra le cultivar, si è utilizzato il test di Tukey al livello di probabilità del 5%.

Per le variabili le cui distribuzioni non sono risultate normali, si sono ispezionati gli istogrammi di frequenza. In generale le distribuzioni non potevano considerarsi normali per la presenza di un picco di valori riferibili alla bassa o all'alta concentrazione della molecola in esame. Un ulteriore esame dei dati ha in generale consentito di attribuire i picchi "anormali" agli oli di alcune accessioni, si sono quindi eliminate le accessioni caratterizzate dai dati anormali e si è riverificata la normalità della distribuzione sulla popolazione selezionata. Se la popolazione selezionata risultava distribuita in modo normale, si è proceduto ad effettuare nuovamente l'ANOVA calcolando eventualmente anche la significatività delle differenze tra le accessioni. L'ANOVA è stata quindi ripetuta per le accessioni escluse, classificandole se necessario mediante il test di Tukey. I risultati sono stati quindi raggruppati in un'unica tabella delle medie.

Caratterizzazione enzimatica delle drupe

Si è effettuata l'ANOVA per valutare l'effetto "cultivar", "epoca di campionamento" e la loro interazione sull'attività enzimatica. E' stata determinata la media dell'attività enzimatica con la differenza significativa e, successivamente, si è calcolata la minima differenza significativa al 5% ($MDS_{5\%}$), utilizzando il test di Tukey.

Influenze ambientali degli oli nell'area gardesana

Si è effettuata l'ANOVA per valutare l'effetto "cultivar", "sito", "anno" e le loro interazioni di primo grado usando il modello lineare generalizzato (GLM). Sul set dei dati chemiometrici è stata calcolate la media di ciascuna variabile per le singole cultivar e per gli anni.

3.6.2 – Analisi di raggruppamento (cluster analysis)

L'analisi di raggruppamento ha lo scopo di stabilire se sia possibile riconoscere dei raggruppamenti omogenei in un certo insieme di osservazioni, di individuare tali raggruppamenti e di descriverli statisticamente.

Caratterizzazione chemiometrica degli oli monovarietal

Sulle medie quadriennali di set di variabili omogenee dal punto di vista chimico, limitatamente a quelle risultate significative all'ANOVA e dopo averle standardizzate secondo la trasformazione $z = (x-\mu)/\sigma$, che consente di rendere confrontabili le distribuzioni di variabili numericamente diverse (la variabile z ha infatti media zero e deviazione standard unitaria), si sono costruiti dendrogrammi di similarità tra le accessioni, utilizzando la distanza euclidea al quadrato e il metodo di aggregazione del legame medio tra i gruppi. Sulla base dell'osservazione visiva dei dendrogrammi e tenendo conto delle significatività delle differenze tra le accessioni messe in evidenza dalle ANOVA, si sono "tagliati" i dendrogrammi individuando di volta in volta gruppi di accessioni tra loro affini dal punto di vista chemiometrico. È stato quindi definito e tabulato il profilo chemiometrico medio dei gruppi di cultivar.

Per definire un indice di somiglianza fenotipica, in relazione alle caratteristiche chemiometriche, per ogni gruppo di variabili omogenee (acidi grassi, trigliceridi, alcoli alifatici e triterpenici, steroli, polifenoli, tocoferoli, pigmenti e composti volatili) ogni accessione è stata classificata nei gruppi scaturiti dalle "cluster analysis" con un criterio binomiale (1=appartenenza al gruppo; 0=non appartenenza al gruppo). È stata quindi calcolata la somiglianza chemiometrica mediante l'indice di Dice, dato da $n/[n+2(N-n)]$, dove n è il numero di concordanze per assenza o presenza dello stesso livello della variabile dicotomica, e N è il numero complessivo di variabili dicotomiche, ottenendo infine il dendrogramma di similarità.

Caratterizzazione aromatica degli oli commerciali

Prima di elaborare statisticamente i dati è stato necessario scalare e trasformare i dati GC in dati ASCII (tempi di ritenzione con relativa altezza dei picchi) e successivamente standardizzarli.

L'analisi statistica dei composti aromatici, inoltre, è stata ristretta ai picchi eluiti nella regione tra 0,8 e 30 minuti.

I valori delle concentrazioni sono state riportati come la media delle determinazioni in triplo, ed i limiti di confidenza erano sotto il 10%. L'analisi di raggruppamento è stata effettuata sui dati gas-cromatografici usando le tecniche agglomerative e divisive.

Il metodo "agglomerativo" inizia con ciascun oggetto come un gruppo separato (tutti i casi sono considerati come gruppi distinti), poi i due gruppi con la più piccola dissimilarità sono uniti ed il processo si ripete fino a formare un singolo gruppo grande (quando tutti i casi sono membri di un singolo gruppo).

Il metodo "divisivo" affronta il raggruppamento dalla direzione opposta, inizia con un grande gruppo (tutti i casi come unico gruppo) e li divide fino a quando tutti gli oggetti sono stati separati in gruppi individuali (ogni campione forma un gruppo).

3.6.3 – Analisi discriminante

Questa analisi tratta insiemi di osservazioni (campioni di olio) in cui sono noti dei gruppi qualitativi di “variabili di classificazione” (nel nostro caso sono le cultivar, gli anni e la provenienza) definiti da più fattori quantitativi di “variabili di analisi-descrittive” (nel caso specifico sono le variabili quantitative chemiometriche). Essa calcola delle funzioni discriminanti, derivate da combinazioni lineari delle variabili originarie, che consentono di massimizzare la distanza tra i gruppi e di minimizzare quella entro i gruppi.

Influenze ambientali sugli oli

Dopo aver effettuato l'analisi della varianza, i dati sono stati elaborati mediante l'analisi discriminante con il metodo step-wise (passo-passo), per ogni gruppo di variabili omogenee, al fine di individuare le variabili chemiometriche più significative per la separazione delle cultivar, degli anni, e delle combinazioni cultivar-regioni nei diversi stadi di maturazione.

Le variabili originarie incluse nelle funzioni discriminanti hanno un “peso” nella capacità di separare i gruppi correlato con il valore assoluto del loro coefficiente, mentre il segno davanti al valore indica il contributo algebrico delle stesse sul modello discriminante.

3.6.4 – Analisi di regressione multipla

L'analisi di regressione multipla consente di verificare la significatività statistica del legame tra una variabile dipendente ed una o più variabili indipendenti.

Correlazione tra la stabilità ossidativa e gli antiossidanti

Nei diversi casi di studio la stabilità ossidativa è stata correlata alle variabili chemiometriche con un potenziale effetto antiossidante (polifenoli, tocoferoli, rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi, pigmenti, ecc.) seguendo il metodo dei minimi quadrati e la procedura “passo-passo”.

3.6.5 – Elaborazione statistica dell'analisi sensoriale

I dati ricavati dalle schede sensoriali sono stati standardizzati per ogni singolo assaggiatore secondo la trasformazione $z=(x-\mu)/\sigma$ per poter confrontare i risultati ottenuti riducendo l'interferenza della scala soggettiva dell'assaggiatore.

I dati normalizzati sono stati elaborati statisticamente all'ANOVA per verificare la significatività degli effetti testati nei diversi modelli sperimentali (influenza del genotipo e degli ambienti Garda ed Italia), e successivamente sono stati elaborati alle analisi multivariate per definire i gruppi di affinità varietale (analisi di raggruppamento), o per individuare le variabili in grado di separare i modelli cultivar, anni e cultivar-regione nei diversi stadi di maturazione (all'analisi discriminante).

Infine, le note sensoriali standardizzate sono state traslate in una scala arbitraria positiva (aggiungendo 1 e moltiplicando per 5) per una più semplice interpretazione e visione dei risultati.

4 – RISULTATI

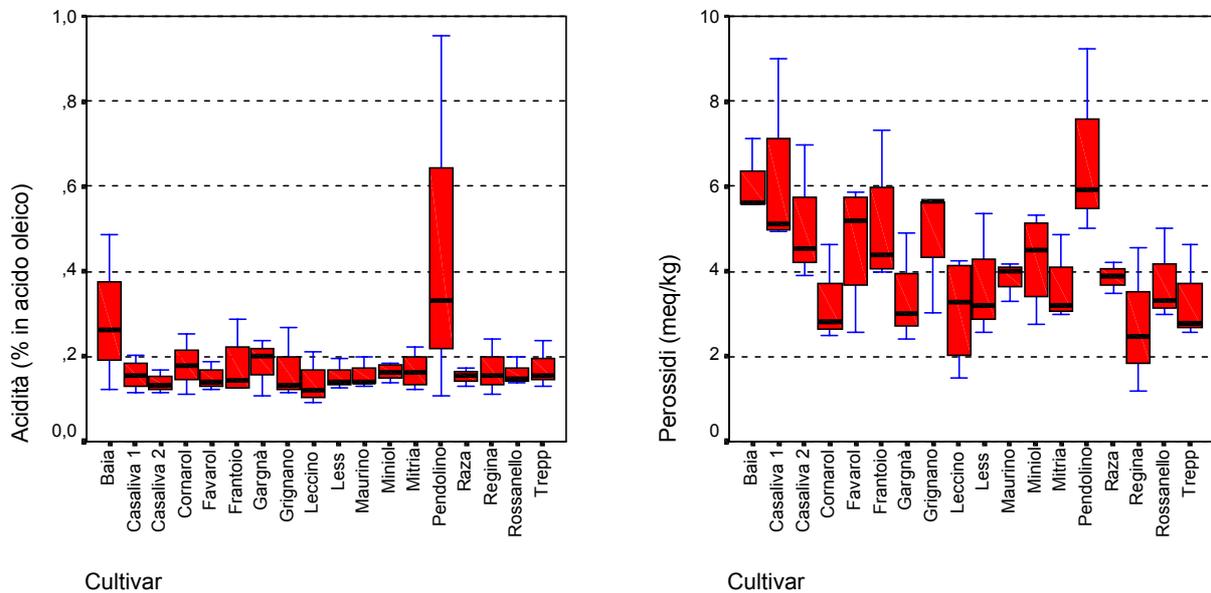
4.1 – GENOTIPO E QUALITÀ: CARATTERIZZAZIONE CHEMIOMETRICA

I dati chimico-fisici ottenuti oli monovarietali allo stadio di maturazione invaiato sono stati raccolti nella tabella 1 al fine di descrivere globalmente l'andamento statistico delle variabili.

Dall'analisi descrittiva delle variabili chemiometriche si osserva che i campioni di olio ottenuti sono tutti di buona qualità e possono essere considerati nella categoria degli oli extra vergini.

I valori di acidità, il numero di perossidi e gli indici spettrofotometrici U.V. sono risultati sempre sotto i livelli soglia previsti dal regolamento CE, 0,8% per l'acidità, 20 meqO₂/kg per i perossidi, 2,50 per il K₂₃₂, 0,22 per il K₂₇₀ e 0,01 per il ΔK; questi indici mostrano che gli oli ottenuti sono tutti genuini e possono essere classificati nella categoria degli extra vergini; nella figura 1 sono rappresentati gli intervalli di acidità e del numero di perossidi per ogni cultivar: l'acidità oscilla da 0,09% per Leccino a 0,95% per Pendolino, con un valore medio di 0,18%, mentre i perossidi variano da 1,18meq/kg per Regina a 9,24meq/kg per Pendolino con una media di 4,32meq/kg.

Figura 1 – Acidità e numero di perossidi: intervalli per cultivar nei 4 anni.



La composizione media in acidi grassi è risultata nella norma, solo pochissimi campioni hanno superato i limiti massimi previsti dalla normativa CE per quanto riguarda il miristico ($\leq 0,05\%$), linoleico ($\leq 0,9\%$), eicosenoico ($\leq 0,4\%$) e behenico ($\leq 0,2\%$); i contenuti medi dei principali saturi sono 11,72% di palmitico e 1,78% di stearico, dei monoinsaturi sono 0,95% di palmitoleico e 78,73% di oleico, dei polinsaturi sono 5,16% di linoleico e 0,68% di linolenico.

La composizione in trigliceridi è risultata anch'essa nella norma, il limite di LLL ($\leq 0,5\%$) è sempre rispettato ed i più rappresentativi sono 10,09% di OOL+P_oOO, 48,5% di OOO e 23,99% di POO+SOL.

La spettrofotometria visibile ha evidenziato che la colorazione dei campioni di olio varia dal giallo al verde avendo i massimi di assorbimento nei colori complementari tra i 414 e 475nm. Il contenuto di pigmenti è molto ampio tra i diversi campioni di olio ed oscilla da 1,4 a 27,36ppm per i carotenoidi e da 0,57 a 50ppm per le clorofille; anche il contenuto in fitolo, alcol diterpenico derivato dall'idrolisi della clorofilla, cambia da 50,43 a 233,91ppm.

La quantità totale di tocoferoli varia molto nei diversi campioni di olio da un minimo di 39,41ppm ad un massimo di 425,91ppm, con un contenuto medio di 180,32ppm; più del 90% è rappresentato dall' α -tocoferolo 38,67-387,16ppm, con una media di 173,13ppm.

Il contenuto totale di polifenoli varia da 55,45 a 615,49ppm, come già indicato in letteratura, e le quantità dei fenoli determinati sono comprese tra 0,05-5,73ppm per l'idrossitirosolo, 0,33-12,23ppm per il tirosolo e 0,95-8,55ppm per il vanillico.

La stabilità ossidativa media è stata di 129,15 giorni per ogni kg di olio, con un minimo di 36,13 giorni/kg ed un massimo di 252,94 giorni/kg.

Il contenuto totale medio di alcoli alifatici è di circa 103,54ppm (molto inferiore al limite di norma di 300ppm), in cui prevalgono quelli a C_n pari, 14,76ppm docosanolo, 28,51ppm tetracosanolo, 39,17ppm esacosanolo e 14,25ppm ottacosanolo.

La quantità media totale di alcoli triterpenici è di 558,53ppm, in cui spiccano maggiormente il cicloartenolo 114,09ppm, il 24-metilencicloartanolo 217,26ppm ed il citrostadienolo 120,60ppm.

Gli steroli totali sono risultati quasi sempre superiori al limite ≥ 1000 ppm di legge, per quanto riguarda la composizione, i valori medi rientrano nei limiti, ci sono solo alcuni campioni che fanno eccezione a riguardo del colesterolo ($\leq 0,5\%$) e del campesterolo ($\leq 4\%$), il β -sitosterolo varia da 76,83 a 90,21% con un valore medio di 80,97%.

La composizione degli aromi ha forti oscillazioni tra i diversi campioni di olio, il contenuto totale varia da 62,82ppm a 2184,19ppm, con una media di 826,23ppm; il più rappresentativo in assoluto è il *trans*-2-esenale 543,39ppm, seguito dal *cis*-3-esen-1-olo 41,28ppm, dall'esenale 35,22ppm, dal *trans*-2-esenolo 33,75ppm, dall'etanolo 30,61, dall'1-penten-3-olo 28,71ppm, dal *cis*-2-penten-1-olo 22,28ppm e dal pentan-3-one 20,61ppm; la maggior parte degli aromi citati C₅ e C₆ derivano dalla "via delle lipossigenasi" e sono i responsabili delle "note verdi" nell'olio extra vergine di oliva.

Tabella 1 - Variabili chemiometriche degli oli monovarietali nei 4 anni (1998, 1999, 2000 e 2001): conta dei dati; valore minimo e massimo; media e deviazione standard.

VARIABILE (unità di misura)	N	MINIMO	MASSIMO	MEDIA	DEV. ST.
Acidità (% ac. oleico)	61	0,09	0,95	0,18	0,12
Perossidi (meq O ₂ /kg)	61	1,18	9,24	4,32	1,59
Spettrofotometria U.V.: K ₂₃₂	61	1,10	1,47	1,30	0,08
K ₂₇₀	61	0,04	0,15	0,09	0,02
ΔK	61	0,000	0,007	0,002	0,002
Acidi grassi: M – miristico C _{14:0} (%)	61	0,00	0,57	0,04	0,10
P – palmitico C _{16:0} (%)	61	9,30	13,93	11,72	1,12
P _o – palmitoleico C _{16:1} (%)	61	0,34	1,85	0,95	0,30
E _a – eptadecanoico C _{17:0} (%)	61	0,02	0,10	0,04	0,01
E _e – eptadecenoico C _{17:1} (%)	61	0,02	1,06	0,14	0,18
S – stearico C _{18:0} (%)	61	1,12	3,25	1,78	0,39
O – oleico C _{18:1} (%)	61	75,90	81,32	78,73	1,58
L – linoleico C _{18:2} (%)	61	3,39	7,76	5,16	0,97
L _n – linolenico C _{18:3} (%)	61	0,41	1,32	0,68	0,17
A – arachico C _{20:0} (%)	61	0,19	0,45	0,31	0,05
E _c – eicosenoico C _{20:1} (%)	61	0,21	0,46	0,31	0,05
B – behenico C _{22:0} (%)	61	0,06	0,76	0,12	0,09
L _g – lignocerico C _{24:0} (%)	61	0,00	0,17	0,03	0,03
Trigliceridi: LLL (%)	61	0,01	0,10	0,03	0,01
OLL _n +P _o P _o L (%)	61	0,05	0,30	0,14	0,06
PLL _n (%)	61	0,02	0,10	0,05	0,02
OLL (%)	61	0,29	2,15	0,75	0,28
OOL _n +P _o OL+PLL (%)	61	0,94	2,45	1,58	0,26
POL _n (%)	61	0,28	1,02	0,58	0,15
E _e OL (%)	61	0,01	0,13	0,06	0,02
OOL+P _o OO (%)	61	6,68	14,52	10,09	1,66
POL+P _o PO (%)	61	3,22	7,82	4,83	0,97
PPL (%)	61	0,05	0,58	0,27	0,15
E _e OO (%)	61	0,06	0,28	0,17	0,06
E _e OP (%)	61	0,03	0,13	0,07	0,03
OOO (%)	61	42,39	55,06	48,50	3,30
POO+SOL (%)	61	19,93	27,85	23,99	1,83
PPO+PSL (%)	61	2,10	4,38	2,93	0,50
E _a OO (%)	61	0,03	0,25	0,09	0,04
E _c OO (%)	61	0,26	0,90	0,62	0,15
SOO (%)	61	2,24	7,09	3,75	0,90
PSO (%)	61	0,44	1,19	0,79	0,17
AOO (%)	61	0,14	1,04	0,55	0,20
SSO (%)	61	0,03	0,36	0,16	0,07
Spettrofotometria VIS: K ₄₁₄	22	0,04	0,83	0,17	0,16
K ₄₄₈	22	0,04	0,70	0,16	0,13
K ₄₇₅	22	0,03	0,57	0,14	0,11
K ₆₇₀	22	0,01	0,44	0,06	0,09
Pigmenti: carotenoidi totali (ppm)	22	1,40	27,36	6,23	5,36
clorofille totali (ppm)	22	0,57	50,00	6,92	10,08
fitolo (ppm)	61	50,43	233,91	119,53	53,15
Tocoferoli: α tocoferolo (ppm)	61	38,67	387,16	173,13	75,90
β tocoferolo (ppm)	61	0,30	15,53	3,14	3,29
γ tocoferolo (ppm)	61	0,22	25,65	4,04	4,70
totali (ppm)	61	39,41	425,91	180,32	81,85
Polifenoli: idrossitirosolo (ppm)	61	0,05	5,73	1,52	1,27
tirosolo (ppm)	61	0,33	12,23	2,99	2,61
vanillico (ppm)	22	0,95	8,55	3,92	2,30
totali (ppm)	61	55,45	615,49	233,29	128,44
Stabilità ossidativa (giorni/kg)	61	36,13	252,94	129,15	46,75

(continua pagina successiva)

RISULTATI – Genotipo e qualità: caratterizzazione chemiometrica

(segue pagina precedente)

VARIABILE (unità di misura)	N	MINIMO	MASSIMO	MEDIA	DEV. ST.
Alcoli alifatici: docosano C ₂₂ -OH (ppm)	61	2,75	43,09	14,76	9,99
tricosano C ₂₃ -OH (ppm)	61	0,53	4,48	1,64	0,86
tetracosano C ₂₄ -OH (ppm)	61	5,87	126,64	28,51	20,51
pentacosano C ₂₅ -OH (ppm)	61	1,24	7,20	3,14	1,21
esacosano C ₂₆ -OH (ppm)	61	14,27	82,55	39,17	14,82
eptacosano C ₂₇ -OH (ppm)	61	0,51	3,58	2,07	0,73
ottacosano C ₂₈ -OH (ppm)	61	5,11	36,52	14,25	5,59
totali (ppm)	61	37,81	287,02	103,54	45,18
Alcoli triterpenici: tirucallo (ppm)	61	0,51	20,49	5,92	3,72
dammaradienolo (ppm)	61	1,87	47,29	13,13	8,41
β-amirina (ppm)	61	5,81	62,08	29,03	14,80
butirospermolo (ppm)	61	19,18	118,51	45,88	21,43
α-amirina (ppm)	61	2,93	19,31	11,75	4,22
cicloartenolo (ppm)	61	44,63	277,31	114,09	54,55
24-metilencicloartano (ppm)	61	39,54	534,05	217,26	123,21
citrostadienolo (ppm)	61	28,94	268,74	120,60	55,93
ciclobrano (ppm)	61	0,20	10,53	2,93	2,38
totali (ppm)	61	207,41	975,37	558,53	216,32
Steroli: colesterolo (%)	61	0,03	1,66	0,27	0,24
brassicasterolo (%)	61	0,01	0,11	0,03	0,03
24-metilencolesterolo (%)	61	0,03	0,45	0,15	0,10
campesterolo (%)	61	2,06	4,97	2,98	0,65
campestanolo (%)	61	0,03	0,42	0,12	0,08
stigmasterolo (%)	61	0,27	1,77	0,65	0,32
Δ7-campesterolo (%)	61	0,01	0,59	0,05	0,10
Δ5,23-stigmastadienolo (%)	61	0,30	0,95	0,49	0,15
cleroasterolo (%)	61	0,30	0,95	0,49	0,14
β-sitosterolo (%)	61	67,83	90,21	80,97	4,94
sitostano (%)	61	0,28	4,69	1,32	0,78
Δ5-avenasterolo (%)	61	3,26	24,87	11,32	4,90
Δ5,24-stigmastadienolo (%)	61	0,19	2,02	0,64	0,29
Δ7-stigmasterolo (%)	61	0,03	0,51	0,14	0,09
Δ7-avenasterolo (%)	61	0,14	0,78	0,38	0,13
eritrodiolo+uvaolo (%)	61	0,13	1,61	0,60	0,38
totali (ppm)	61	822,94	2097,99	1359,35	286,97
Aromi: n-ottano (ppm)	60	0,33	33,28	3,39	5,04
etil acetato (ppm)	60	0,28	80,92	13,42	17,70
2-metilbutanale (ppm)	60	0,04	37,65	4,51	7,37
3-metilbutanale (ppm)	60	0,04	43,90	5,64	9,13
etanolo (ppm)	60	3,47	217,74	30,61	32,37
pentan-3-one (ppm)	60	0,88	119,57	20,61	22,98
1-penten-3-one (ppm)	60	0,81	27,76	9,53	5,97
esanale (ppm)	60	0,53	144,16	35,22	31,81
2-metil-1-propanolo (ppm)	60	0,04	2,69	0,76	0,59
trans-2-pentenale (ppm)	60	0,09	32,38	7,48	6,91
1-penten-3-olo (ppm)	60	1,63	74,05	28,71	19,73
3-metil-1-butanolo (ppm)	60	0,38	15,08	6,14	3,98
trans-2-esenale (ppm)	60	1,25	1863,53	543,39	514,75
1-pentanolo (ppm)	60	0,04	6,77	1,05	1,47
cis-2-penten-1-olo (ppm)	60	1,61	139,94	22,28	19,80
1-esanolo (ppm)	60	1,07	89,48	17,44	19,24
cis-3-esen-1-olo (ppm)	60	1,83	258,64	41,28	52,50
trans-2-esenolo (ppm)	60	0,22	304,42	33,75	49,75
acido acetico (ppm)	60	0,04	1,14	0,33	0,25
1-ottanolo (ppm)	60	0,24	7,09	0,70	0,92
totali (ppm)	60	62,82	2184,19	826,23	572,99

4.1.1 – Acidi grassi

Grignano è caratterizzato per un alto valore di oleico; Leccino per un alto contenuto di palmitico; Maurino per un basso valore di eicosenoico; Miniol per un alto valore di palmitoleico e basso di linolenico; Mitria per bassi valori di palmitico e palmitoleico, ed alto di stearico; Pendolino per bassi contenuti di stearico ed arachico, ed alto di linolenico; Regina per un basso valore di linoleico; Rossanello per elevati quantità di arachico ed eicosenoico; ed infine Trepp per un basso valore di oleico ed alto di linoleico (tabella 2).

Gli acidi grassi C_{14:0} miristico, C_{17:0} eptadecanoico, C_{17:1} eptadecenoico, C_{22:0} behenico e C_{24:0} lignocericico non sono risultati significativi per differenziare le cultivar.

Tabella 2 – Acidi grassi: composizione per cultivar nei 4 anni (%).

CULTIVAR	Miristico	Palmitico	Palmitoleico	Eptadecanoico	Eptadecenoico	Stearico	Oleico
Baia	0,00 a ¹	12,33 cd	0,88 bcd	0,04 a	0,06 a	2,17 e	77,87 abc
Casaliva 1	0,01 a	11,53 abcd	0,74 abc	0,04 a	0,09 a	1,64 abcd	78,99 abcd
Casaliva 2	0,01 a	11,06 abc	0,68 ab	0,04 a	0,09 a	1,62 abcd	80,05 bcd
Cornarol	0,20 a	11,40 abcd	1,25 def	0,05 a	0,38 a	1,56 abc	79,93 bcd
Favarol	0,01 a	12,22 cd	1,10 cdef	0,04 a	0,10 a	1,45 ab	77,72 abc
Frantoio	0,12 a	11,10 abc	0,78 bc	0,06 a	0,34 a	1,64 abcd	78,84 abcd
Gargnà	0,01 a	12,71 cd	0,99 bcde	0,04 a	0,11 a	1,94 cde	77,23 ab
Grignano	0,01 a	10,03 ab	0,85 bcd	0,05 a	0,11 a	2,07 de	81,10 d
Leccino	0,10 a	13,48 d	1,23 def	0,05 a	0,25 a	1,63 abcd	77,71 abc
Less	0,01 a	11,39 abcd	0,74 abc	0,03 a	0,07 a	1,70 bcd	79,12 abcd
Maurino	0,04 a	12,70 cd	1,33 ef	0,04 a	0,13 a	1,55 abc	77,48 abc
Miniol	0,01 a	11,85 abcd	1,45 f	0,03 a	0,09 a	1,66 bcd	78,54 abcd
Mitria	0,05 a	9,77 a	0,38 a	0,06 a	0,12 a	2,75 f	80,44 cd
Pendolino	0,02 a	11,89 bcd	0,82 bc	0,04 a	0,09 a	1,20 a	79,04 abcd
Raza	0,02 a	12,42 cd	1,13 cdef	0,04 a	0,11 a	1,53 abc	77,86 abc
Regina	0,01 a	11,70 abcd	0,90 bcd	0,04 a	0,09 a	2,04 de	79,96 bcd
Rossanello	0,01 a	11,57 abcd	0,78 bc	0,04 a	0,09 a	2,02 de	78,69 abcd
Trepp	0,01 a	12,08 bcd	1,11 cdef	0,03 a	0,09 a	1,83 bcde	76,20 a

CULTIVAR	Linoleico	Linolenico	Arachico	Eicosenoico	Behenico	Lignocericico
Baia	5,31 bcd	0,68 abcd	0,30 abc	0,25 ab	0,07 a	0,02 a
Casaliva 1	5,56 cd	0,62 abc	0,32 bc	0,33 cde	0,10 a	0,03 a
Casaliva 2	5,00 abcd	0,64 abcd	0,32 bc	0,35 de	0,10 a	0,03 a
Cornarol	3,87 ab	0,58 ab	0,30 abc	0,31 abcd	0,14 a	0,04 a
Favarol	5,93 de	0,73 bcde	0,26 ab	0,32 cde	0,10 a	0,02 a
Frantoio	5,52 cd	0,65 abcd	0,32 bc	0,34 cde	0,27 a	0,02 a
Gargnà	5,55 cd	0,59 ab	0,35 bc	0,32 bcde	0,11 a	0,03 a
Grignano	4,28 abc	0,71 bcde	0,33 bc	0,32 cde	0,09 a	0,03 a
Leccino	4,15 abc	0,63 abcd	0,30 abc	0,28 abc	0,13 a	0,06 a
Less	5,50 cd	0,65 abcd	0,32 bc	0,36 de	0,09 a	0,02 a
Maurino	5,23 abcd	0,83 de	0,31 abc	0,24 a	0,12 a	0,01 a
Miniol	5,12 abcd	0,50 a	0,34 bc	0,30 abcd	0,10 a	0,02 a
Mitria	4,79 abcd	0,80 cde	0,36 bc	0,31 abcd	0,13 a	0,03 a
Pendolino	5,00 abcd	1,21 f	0,21 a	0,36 de	0,09 a	0,03 a
Raza	5,59 cd	0,59 ab	0,30 abc	0,30 abcd	0,09 a	0,02 a
Regina	3,75 a	0,88 e	0,28 ab	0,25 ab	0,07 a	0,02 a
Rossanello	5,30 bcd	0,56 ab	0,39 c	0,39 e	0,14 a	0,03 a
Trepp	7,43 e	0,55 ab	0,29 ab	0,27 abc	0,09 a	0,02 a

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

4.2 – GENOTIPO E QUALITÀ: CARATTERIZZAZIONE ENZIMATICA

Il confronto dell'andamento dei due enzimi nel corso della maturazione delle drupe mostra una grande variabilità dell'attività sia tra le cultivar, sia tra le date dei prelievi.

4.2.1 – Lipossigenasi

L'attività enzimatica della lipossigenasi (figura 17 e tabella 26) è risultata sempre significativamente differente tra le cultivar, ad eccezione dell'attività registrata il 7 novembre 2001.

La minima differenza significativa al 5% ($MDS_{5\%}$) è risultata essere uguale a 0,072 per entrambi gli anni.

Nel complesso dei 2 anni, l'attività enzimatica della lipossigenasi ha un'evoluzione analoga per tutte 3 le cultivar: mediamente alta (circa 0,4 U/g s.s.) durante la fase d'accrescimento delle olive (settembre – ottobre), bassa (circa 0,3 U/g s.s.) durante l'invaiaitura (novembre), ed infine alta (circa 0,5 U/g s.s.) nella fase finale di maturazione (dicembre).

Nel 2000 l'attività nelle cultivar Leccino e Frantoio è tendenzialmente alta (circa 0,4 U/g s.s.) durante l'accrescimento delle olive (1 settembre – 27 ottobre), poi diminuisce (circa 0,25 U/g s.s.) durante la fase di invaiatura (3 novembre – 1 dicembre), ed infine aumenta (circa 0,5 U/g s.s.) nella fase finale della maturazione (15 dicembre). Anche la cultivar Casaliva ha un andamento simile, con eccezione del picco nel campionamento del 17 novembre.

Nel 2001 Casaliva e Frantoio hanno inizialmente (8 – 29 agosto) un'attività enzimatica bassa (circa 0,3 U/g s.s.), in seguito cresce (circa 0,4 U/g s.s.) durante la fase di accrescimento delle olive (19 settembre – 24 ottobre), per poi diminuire leggermente (circa 0,35 U/g s.s.) durante la fase di invaiatura, ed infine aumentare nuovamente (circa 0,45 U/g s.s.) nella fase finale di maturazione. La cultivar Leccino ha un andamento simile, ma con un anticipo di circa 7-15 giorni: infatti a maturazione ha un innalzamento di attività a 0,624 U/g s.s., probabilmente dovuto alla maturazione più precoce rispetto alle precedenti varietà.

4.2.2 – Idroperossido liasi

L'enzima idroperossido liasi (figura 18 e tabella 27) risulta avere un'attività più alta rispetto alla lipossigenasi e più costante, probabilmente perché meno soggetta ai fattori ambientali. Le attività del 1 dicembre nel 2000, dell'8 agosto e del 7 novembre nel 2001 non sono risultate significative tra le cultivar.

La minima differenza significativa al 5% ($MDS_{5\%}$) è risultata essere di 0,134 per l'anno 2000 e di 0,196 per l'anno 2001.

Complessivamente nei 2 anni l'evoluzione dell'attività enzimatica sembra essere costante. Nel primo periodo di accrescimento cellulare e di accumulo di olio (agosto – ottobre) risulta piuttosto costante (circa 1 U/g s.s.), per poi aumentare nella fase finale dell'invaiaitura e di maturazione (novembre – dicembre), anche se nelle 2 annate il livello raggiunto è nettamente diverso, circa 1,3 U/g s.s. nel 2000 e circa 2,2 U/g s.s. nel 2001, dovuto probabilmente alle condizioni climatiche verificatesi durante l'ultimo periodo di maturazione.

Nel 2000 Frantoio e Leccino mostrano un'attività enzimatico abbastanza costante (circa 0,8 U/g s.s.) nel primo periodo durante l'accrescimento dei frutti e l'accumulo di olio (agosto – ottobre), che poi aumenta (circa 1,2 U/g s.s.) nella fase finale dell'inviatura e maturazione fisiologica dell'oliva (novembre – dicembre). La cultivar Casaliva, invece, presenta un'attività abbastanza costante e più alta rispetto alle precedenti (circa 1,3 U/g s.s.) in tutto il suo periodo di maturazione.

Nel 2001 le attività enzimatiche di tutte 3 le cultivar presentano una maggior costanza (circa 1 U/g s.s.) nella fase iniziale di accrescimento ed accumulo di olio (agosto – ottobre), mentre nelle fasi finale di inviatura e maturazione fisiologica (novembre – dicembre) l'attività cresce fino a 2 U/g s.s. circa per Casaliva e Leccino e fino a 2,738 U/g s.s. per Frantoio, con un ritardo di 2 settimane rispetto alle precedenti.

Figura 17 – Lipossigenasi: attività enzimatica (U / g s.s.) nelle cultivar nei due anni (2000 e 2001).

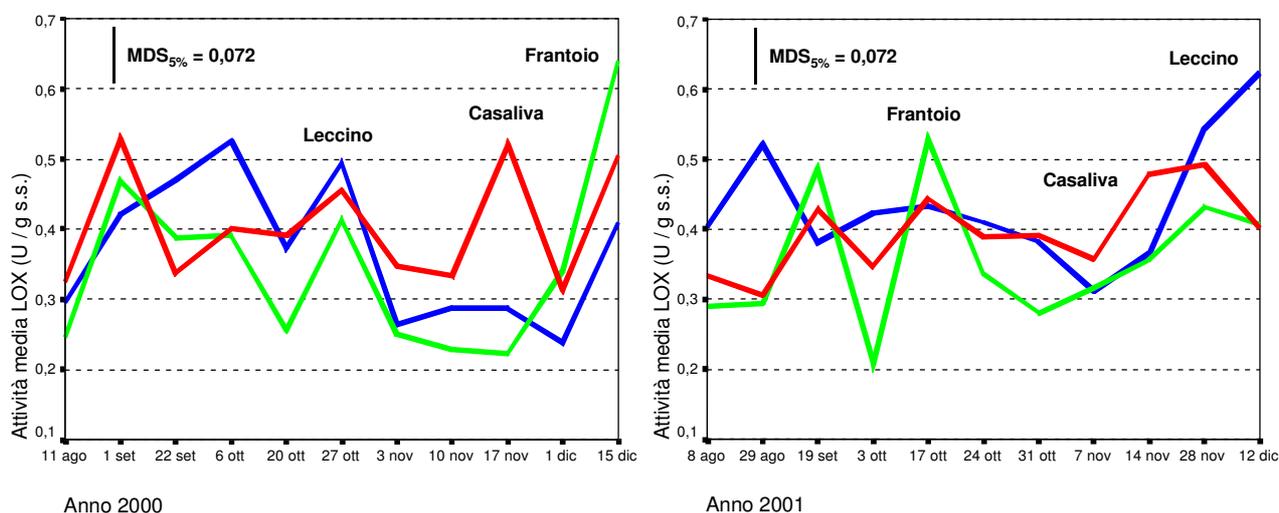


Tabella 26 – Lipossigenasi: attività enzimatica (unità / g s.s.) nelle cultivar nei due anni (2000 e 2001).

2000	11-ago	1-set	22-set	6-ott	20-ott	27-ott	3-nov	10-nov	17-nov	1-dic	15-dic
Casaliva	0,325b ¹	0,528b	0,338a	0,400a	0,391b	0,456ab	0,347b	0,333b	0,520b	0,314b	0,505b
Frantoio	0,246a	0,470ab	0,387a	0,391a	0,256a	0,413a	0,249a	0,228a	0,222a	0,340b	0,639c
Leccino	0,295ab	0,421a	0,471b	0,525b	0,373b	0,494b	0,263a	0,288ab	0,287a	0,238a	0,409a

2001	8-ago	29-ago	19-set	3-ott	17-ott	24-ott	31-ott	7-nov	14-nov	28-nov	12-dic
Casaliva	0,333ab	0,306a	0,429ab	0,347b	0,444a	0,389ab	0,391b	0,357a	0,478b	0,493ab	0,401a
Frantoio	0,289a	0,293a	0,486b	0,208a	0,528b	0,336a	0,280a	0,315a	0,356a	0,432a	0,406a
Leccino	0,404b	0,522b	0,381a	0,423c	0,433a	0,410b	0,382b	0,312a	0,365a	0,544b	0,624b

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Figura 18 – Idroperossido liasi: attività enzimatica (U / g s.s.) nelle cultivar nei due anni (2000 e 2001).

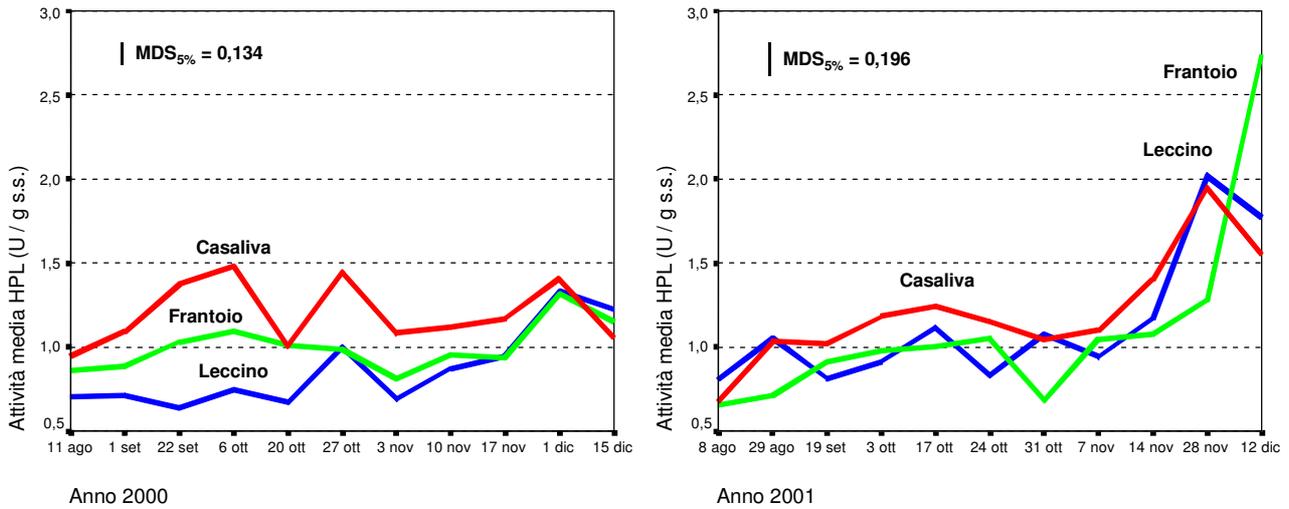


Tabella 27 – Idroperossido liasi: attività enzimatica (U / g s.s.) nelle cultivar nei due anni (2000 e 2001).

2000	11-ago	1-set	22-set	6-ott	20-ott	27-ott	3-nov	10-nov	17-nov	1-dic	15-dic
Casaliva	0,943b ¹	1,089c	1,374c	1,480c	1,007b	1,443b	1,080b	1,120b	1,168b	1,406a	1,053a
Frantoio	0,860b	0,884b	1,029b	1,093b	1,009b	0,986a	0,811a	0,953a	0,939a	1,314a	1,149ab
Leccino	0,703a	0,711a	0,635a	0,745a	0,669a	0,996a	0,691a	0,871a	0,946a	1,332a	1,221b

2001	8-ago	29-ago	19-set	3-ott	17-ott	24-ott	31-ott	7-nov	14-nov	28-nov	12-dic
Casaliva	0,678a	1,031b	1,015b	1,180b	1,241b	1,152b	1,043b	1,098a	1,399b	1,946b	1,551a
Frantoio	0,650a	0,713a	0,910ab	0,979a	1,000a	1,048b	0,682a	1,043a	1,074a	1,278a	2,738c
Leccino	0,807a	1,051b	0,812a	0,913a	1,112ab	0,830a	1,076b	0,940a	1,170a	2,019b	1,772b

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

4.2.3 – Considerazioni

Le attività enzimatiche della lipossigenasi e dell'idroperossido liasi della cultivar Casaliva risultano essere quasi sempre superiori a quelle della varietà Frantoio in entrambi gli anni, mentre in Leccino mostrano andamenti diversificati nei due anni.

Si può, inoltre, osservare che nella fase finale dell'inviatura (seconda e terza decade di novembre) le attività enzimatiche aumentano in tutte le cultivar (fa eccezione la lipossigenasi nel 2000); tale innalzamento potrebbe essere utilizzato come indice di raccolta ottimale, in quanto tali enzimi sono responsabili della sintesi dei composti aromatici.

Pertanto, i risultati dello studio dell'attività enzimatica della lipossigenasi e dell'idroperossido liasi possono essere molto importanti dal punto di vista della produzione di "olio di qualità", in quanto possono indicare l'ottimo intervallo per la raccolta delle olive, al fine di ottenere oli più ricchi in sostanze aromatiche.

Inoltre, questi dati mostrano la possibilità di poter studiare le correlazioni tra le attività enzimatiche nei frutti ed i livelli dei composti volatili negli oli delle differenti cultivar e nelle diverse condizioni ambientali.

4.3 – GENOTIPO E QUALITÀ: CARATTERIZZAZIONE AROMATICA

Secondo i risultati della valutazione sensoriale tutti i campioni di olio commerciali analizzati appartenevano alla categoria degli oli extra vergini, ad eccezione del campione 36 fatto ossidare appositamente per avere un confronto con un olio rancido.

L'analisi statistica dei profili aromatici è stata ristretta ai picchi della regione tra 0,8 e 30 minuti per due motivi: innanzitutto pochi composti volatili eluivano fuori da questa regione ed eventualmente quelli trovati erano in basse concentrazioni; secondariamente si è osservato che i picchi a 32, 34 e 37 minuti erano presenti anche nelle prove in bianco della siringa SPME, quindi derivavano dalla decomposizione della fibra di polisilossano della stessa, e per cui non dovevano essere considerati nei campioni di olio. La conseguenza di questa restrizione, inoltre, non ha permesso di quantificare i composti C₅ (essendo molto volatili eluivano subito e tutti insieme), e l'attenzione si è concentrata sui composti volatili "più pesanti" da C₆ a C₁₀ anch'essi componenti importanti nella frazione aromatica volatile dell'olio vergine di oliva (Reiners and Grosch 1998).

I composti volatili con una concentrazione superiore ad 1,0 mg/kg sono indicati nella tabella 28. L'errore standard per la ripetizione delle analisi di un singolo composto volatile nello stesso olio è risultato inferiore al 10% per tutti gli analiti e generalmente meno del 4%. Alcuni composti volatili erano presenti in concentrazioni elevate (tra 1 e 3 mg/kg), ma relativamente in pochi campioni e, quindi, non sono stati citati nella tabella; così pure non sono stati indicati alcuni composti volatili del campione 36 (olio rancido), nonostante le alte concentrazioni.

L'aspetto più importante dei dati ottenuti è stata la distinzione degli oli australiani da quelli europei, nei quali il *trans*-2-esenale era il composto volatile dominante (come riportato in letteratura). Negli oli australiani, invece, il *trans*-2-esenale era il componente volatile maggiore in meno del 50% degli oli analizzati. Le diversità osservate nei profili dei composti volatili negli oli potrebbe, di conseguenza, indicare una differenza nell'importanza relativa delle vie biosintetiche dei composti aromatici negli oli australiani ed europei.

Questo lavoro ha dimostrato, infine, la convenienza della SPME nell'estrazione dei composti volatili negli oli di oliva, nonostante la tecnica dello spazio di testa dinamico rimanga ancora la procedura preferita perché offre un maggior numero di informazioni sui composti volatili. La SPME offre i vantaggi di: non usare solventi per il recupero dei composti volatili; facilitare le operazioni di estrazione degli aromi, in particolare riducendo il tempo di preparazione del campione (20-30 minuti contro 2-3 ore); ed infine estrarre i composti volatili con una risposta lineare nell'intervallo di 0,01-100mg/g olio con un r² superiore a 0,9 in tutti i casi.

4.3.1 – Influenza della cultivar

In considerazione della eterogeneità degli oli studiati (per cultivar, date di raccolta, produttori e sistemi di lavorazione) non si sapeva se i metodi statistici utilizzati fossero in grado di classificare gli oli in gruppi o se avessero identificato una serie ininterrotta, ma sia il metodo "agglomerativo" che quello "divisivo" (figura 19) hanno fornito classificazioni simili, ad eccezione degli oli 9, 33 e 39.

Gli oli 2 e 3, 22 e 27, 25 e 28, 29 e 30, che erano oli identici analizzati in doppio, sono stati classificati negli stessi gruppi in entrambi i metodi statistici.

Gli oli derivati dalla cultivar Corregiola ed alcuni altri (5, 7, 10, 11, 15, 18, 26 e 31) sono caratterizzati da un'alta concentrazione di *trans*-2-esenale (più di 20 mg/kg) e sono risultati distinti da quelli con contenuti inferiori (8, 9, 12, 16 e 20). Entrambi i gruppi, successivamente, si uniscono avendo in comune mediamente 1,5-3,0 mg/kg di ottanale, un composto che non risultava presente in molti altri campioni.

Gli oli di Manzanillo (14, 19, 29, 30 e 32) sono risultati anch'essi classificati dentro uno stesso gruppo (insieme a campioni di altra origine), caratterizzati da un composto non identificato con un tempo di ritenzione di 23,7 minuti, e mediamente in tali oli il livello di esanale superava quello del *trans*-2-esenale.

Un ulteriore terzo gruppo (6, 9, 13, 17, 24, 25 e 28) contenente oli da cultivar miste era caratterizzato da livelli intermedi di *trans*-2-esenale (5-10 mg/kg) e nona-2,4-dienale, approssimativamente nella stessa concentrazione.

4.3.2 – Influenza della maturazione

La data di raccolta non ha esercito un'influenza significativa sul profilo dei composti volatili, nonostante si siano osservati dei parziali raggruppamenti, mentre la cultivar si è confermata essere il fattore più importante nella determinazione del profilo aromatico.

4.3.3 – Influenza della gramolazione

L'aumento della temperatura di gramolazione è risultata associata con una riduzione nella quantità di esanale e *trans*-2-esenale, mentre il livello di entrambi i composti volatili aumentava all'aumentare del tempo di gramolazione (tabella 29). Questi cambiamenti, comunque, non sono risultati statisticamente significativi, con l'eccezione nella diminuzione di esanale associata con l'aumento della temperatura, in accordo con i risultati di Ranalli *et al.* (2001c) e di Angerosa *et al.* (2001) per la cultivar Coratina, ma non con la cultivar Frantoio (varietà simile alla cultivar Corregiola). La diminuzione nella formazione dei composti volatili all'aumento della temperatura di gramolazione può essere attribuito all'inattivazione dell'idroperossido liasi, le quali sono critiche nella formazione dei composti volatili C₆ (Salas e Sanchez, 1999). Ciò potrebbe significare che tempo e temperatura di gramolazione devono essere ottimizzate per ogni cultivar al fine di raggiungere il migliore profilo aromatico desiderabile.

Tabella 28 – Composti volatili: composizione negli oli di oliva commerciali mediante SPME-GC-FID (ppm).

N° OLIO	Etil isobutirrato	Esanale	<i>trans</i> -2-esenale	1-esanolo	Ottanale	Esil acetato	<i>trans</i> -2-ottanale	Nonanale	Nona-2,4-dienale	4-etil guaiacol	<i>trans,cis</i> -deca- -2,4-dienale	<i>trans</i> -4,5-epossi- - <i>trans</i> -2-decenale	Damascenone	Aldeide I sconosciuta	Aldeide II sconosciuta
1	1,8	1,3	4,6	-	-	2,4	-	2,0	4,2	2,2	-	3,9	9,9	7,6	3,6
2	3,8	10,1	2,0	-	2,0	2,4	-	3,1	-	3,2	2,0	3,7	3,6	4,7	3,3
3	3,3	8,9	2,4	-	2,1	2,2	-	3,4	1,6	3,1	2,1	3,5	3,5	4,5	6,1
4	1,6	9,6	2,6	-	2,5	3,6	2,2	3,2	7,6	3,6	1,7	5,9	11,6	3,4	2,8
5	2,3	4,1	31,4	1,6	3,0	1,7	-	3,1	3,0	3,7	-	3,7	2,1	2,6	5,0
6	-	3,4	11,0	-	2,5	2,2	-	2,3	12,3	2,4	-	3,3	4,7	7,7	4,2
7	2,5	3,0	21,1	1,8	2,5	4,0	-	2,9	2,0	2,7	1,7	3,6	5,0	2,6	3,6
8	2,1	6,1	14,8	-	1,9	4,4	2,8	4,7	6,0	3,8	2,6	4,9	12,6	3,5	5,5
9	1,6	2,9	10,6	-	2,2	3,0	-	3,3	8,5	2,7	2,6	3,4	3,5	2,9	5,3
10	2,1	3,1	30,7	-	2,8	-	-	2,8	-	2,8	2,2	3,5	1,7	1,9	3,2
11	1,8	3,4	26,3	-	2,3	2,2	-	3,2	2,2	2,8	2,9	3,9	3,7	3,3	3,6
12	1,9	3,0	17,5	-	1,8	2,0	-	2,6	4,1	2,8	2,5	5,5	17,3	2,1	5,0
13	1,6	3,1	11,4	-	-	1,9	2,9	2,3	8,5	2,4	2,9	3,1	4,7	7,1	3,3
14	-	3,5	2,7	1,6	-	-	-	2,4	6,8	2,2	2,1	3,0	4,5	25,3	4,2
15	1,7	2,8	24,9	2,1	1,7	-	-	2,2	-	2,6	1,9	3,1	1,7	2,5	3,3
16	1,8	2,0	10,4	1,7	2,0	-	-	1,6	3,2	2,2	-	4,8	14,3	3,5	2,4
17	1,6	2,9	9,8	-	-	2,4	-	1,9	11,1	2,2	-	3,9	9,9	4,0	3,7
18	1,7	3,1	23,0	1,6	1,8	-	-	2,2	3,5	2,2	1,6	2,3	2,0	6,2	2,7
19	-	2,8	-	-	-	-	-	2,0	5,5	2,0	-	2,5	3,5	33,4	3,8
20	1,9	2,4	16,0	2,9	1,7	-	-	2,1	3,9	1,8	-	2,2	2,5	3,5	2,3
21	-	2,3	7,8	2,5	-	-	1,9	2,0	2,2	2,0	1,7	2,8	5,5	11,3	3,5
22	1,9	4,3	-	-	-	-	-	2,0	4,6	1,9	-	2,7	5,4	30,0	3,2
23	1,8	4,5	2,1	1,8	-	-	-	2,0	2,0	2,5	-	5,9	5,9	4,4	3,0
24	1,6	2,0	7,5	1,6	-	1,8	2,1	1,8	7,7	2,0	-	2,8	4,0	4,9	3,2
25	1,6	1,9	5,7	1,8	-	-	-	2,0	8,2	2,1	-	2,4	2,8	3,4	3,8
26	1,6	2,7	21,1	-	-	-	-	2,0	3,7	2,3	-	3,7	2,3	4,4	2,8
27	1,7	4,1	-	-	-	-	-	1,9	4,4	1,9	-	2,6	5,2	27,6	3,7
28	1,9	3,8	5,4	1,7	-	-	-	1,8	7,8	2,0	-	2,5	2,7	3,4	2,9
29	1,6	4,0	3,6	-	-	-	-	1,9	5,0	2,2	-	3,0	2,9	14,0	2,8
30	1,3	3,5	3,5	-	-	-	-	1,7	4,9	1,6	-	2,1	2,9	15,5	2,5
31	-	3,0	22,4	-	-	-	-	1,9	1,6	2,8	1,6	2,3	1,6	2,3	2,5
32	1,7	3,2	3,0	1,6	-	-	-	2,0	5,6	1,9	-	2,5	2,9	22,0	3,2
33	1,6	2,6	4,8	-	1,7	-	-	1,9	2,8	1,7	-	3,4	1,6	3,3	2,7
34	2,9	6,9	4,6	2,3	2,7	2,0	-	3,0	3,9	3,3	1,5	3,5	2,8	5,9	2,0
35	9,8	2,9	1,6	3,8	2,0	2,4	1,7	2,3	6,5	2,6	-	3,2	6,5	4,2	2,8
36	-	30,7	3,4	19,8	6,6	4,5	5,2	11,0	15,2	15,4	7,8	6,5	5,9	-	2,4
37	3,1	3,7	2,0	6,5	2,7	2,9	-	2,6	3,2	2,9	1,7	3,2	3,4	3,2	3,7
38	2,4	2,1	3,0	4,4	-	7,9	-	3,2	1,7	2,7	2,1	4,1	9,0	2,7	3,1
39	2,4	2,2	3,3	8,8	1,6	-	2,0	2,3	9,2	2,4	1,6	3,3	6,6	16,0	4,6
40	2,4	3,3	7,6	2,6	1,7	-	2,4	2,6	10,0	2,8	1,8	3,4	5,0	13,7	3,6

- Il trattino indica che il composto non era rilevato ad un livello di 1,0 mg/kg

Figura 19 – Composti volatili: dendrogrammi di similarità tra gli oli di oliva commerciali.

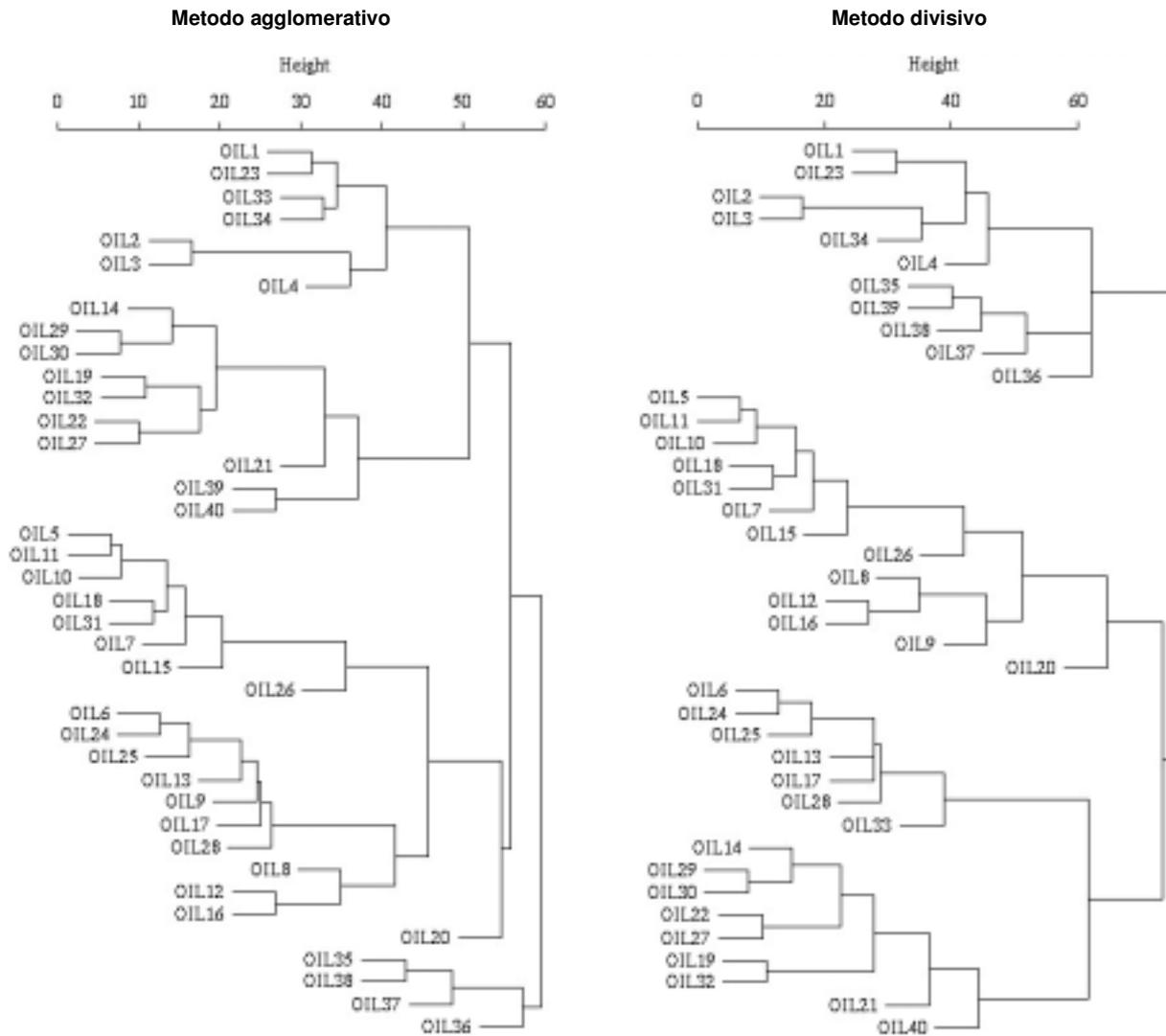


Tabella 29– Esanale e *trans-2-esenale*: contenuti negli oli di laboratorio per effetto della gramolazione (ppm).

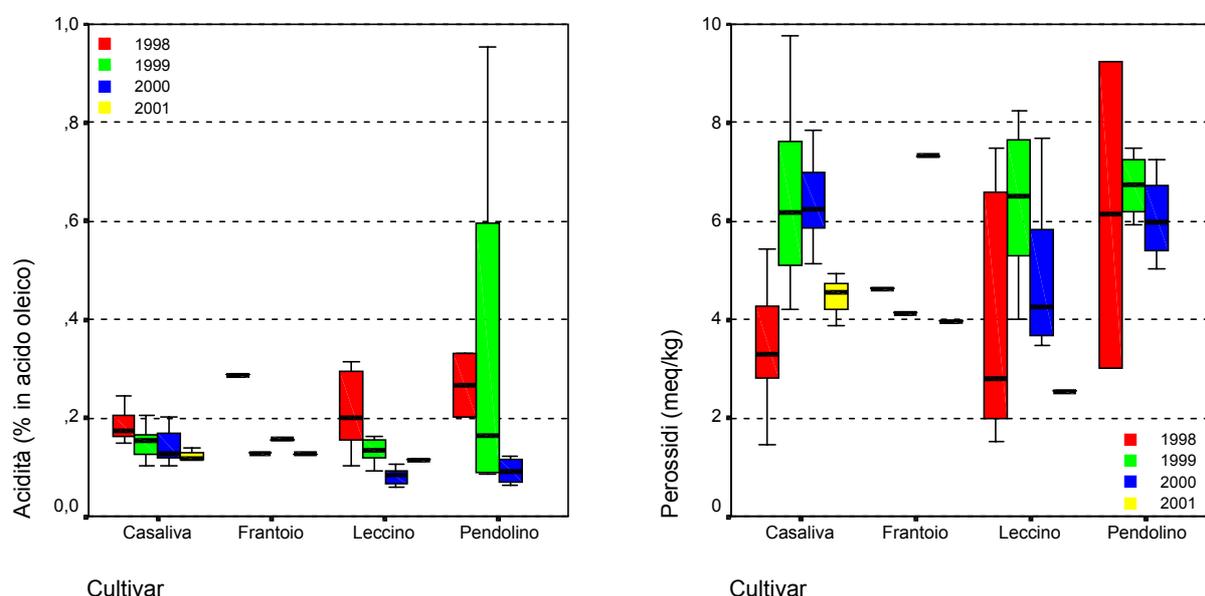
CONDIZIONI DI GRAMOLAZIONE		CONCENTRAZIONI DEI COMPOSTI VOLATILI	
Tempo	Temperatura	Esanale	<i>trans-2-esenale</i>
15 min	25 °C	3,5 ± 0,8	25,4 ± 3,9
15 min	35 °C	2,7 ± 0,8	22,4 ± 4,8
60 min	25 °C	3,9 ± 1,0	27,5 ± 2,9
60 min	35 °C	3,1 ± 0,6	23,9 ± 2,7

4.4 – AMBIENTE E QUALITÀ: INFLUENZE NELL'AREA GARDESANA

Gli oli ottenuti dalle cultivar Casaliva, Frantoio, Leccino e Pendolino nelle 17 aziende olivicole site sulla sponda bresciana del lago di Garda nei 4 anni di riferimento (1998, 1999, 2000 e 2001) sono risultati tutti di buona qualità.

I valori dell'acidità e del numero di perossidi (figura 20) sono sempre contenuti sotto i livelli massimi previsti dai regolamenti CE al fine della classificazione in oli extra vergini ($\leq 0,8\%$ per l'acidità e ≤ 20 meq O_2/kg per i perossidi). La cultivar Pendolino mostra un ampio intervallo di acidità, soprattutto nel 1999, mentre Casaliva, Frantoio e Leccino risultano più contenute, variando da circa 0,1 a 0,3%. Il numero di perossidi è oscillato tra 3 e 8 meq O_2/kg in tutte le cultivar.

Figura 20 – Acidità e numero di perossidi: intervalli per cultivar nei 4 anni.



Le variabili chemiometriche hanno mostrato una significatività differente a seconda delle costanti considerate, nel complesso le cultivar sono risultate quasi sempre significativamente diverse, gli anni abbastanza spesso, i siti solo raramente, e quasi mai le loro interazioni di primo grado.

Nella tabella 30 sono indicati i valori della significatività per le diverse variabili chimiche: gli acidi grassi ed i tocoferoli sono risultati quasi sempre significativamente diversi tra le cultivar, un po' meno tra gli anni e molto poco tra i siti e nelle interazioni; i trigliceridi hanno fornito differenze significative tra le cultivar, gli anni ed i siti, ma pochissime nelle interazioni; gli alcoli alifatici, triterpenici e gli steroli sono risultati spesso significativamente diversi fra le cultivar, poco tra gli anni ed i siti, e quasi mai nelle interazioni; i polifenoli e gli aromi hanno dato poche differenze significative tra le cultivar ed i siti, molte tra gli anni e pochissime nelle interazioni; i pigmenti e la stabilità ossidativa sono risultate spesso non significativamente diversi fra le tre costanti.

L'analisi discriminante ha confermato che le variabili sono in grado di separare le cultivar ed in misura minore gli anni, mentre i siti non sono stati mai separati, nonostante all'ANOVA si siano osservate delle differenze significative.

Tabella 30 – Variabili chemiometriche: significatività tra cultivar, anni, siti ed interazioni di primo grado.

VARIABILE (unità di misura)	CULTIVAR	ANNI	SITI	CV x ANNI	CV x SITI	ANNI x SITI
Acidi grassi:						
M – miristico C_{14:0} (%)	0,010	0,000	0,040	0,000	n.s.	n.s.
P – palmitico C_{16:0} (%)	0,000	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P_o – palmitoleico C_{16:1} (%)	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E_a – eptadecanoico C_{17:0} (%)	0,000	0,040	n.s.	0,002	n.s.	0,018
E_e – eptadecenoico C_{17:1} (%)	0,001	0,000	n.s.	0,000	n.s.	n.s.
S – stearico C_{18:0} (%)	0,000	n.s.	0,006	n.s.	n.s.	n.s.
O – oleico C_{18:1} (%)	n.s.	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
L – linoleico C_{18:2} (%)	0,000	0,033	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
L_n – linolenico C_{18:3} (%)	0,000	0,002	0,001	n.s.	0,000	n.s.
A – arachico C_{20:0} (%)	0,000	0,016	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E_c – eicosenoico C_{20:1} (%)	0,007	n.s.	n.s.	n.s.	0,044	n.s.
B – behenico C_{22:0} (%)	0,000	0,000	n.s.	0,000	0,026	n.s.
L_g – lignocerico C_{24:0} (%)	n.s.	0,002	n.s.	0,026	n.s.	n.s.
Trigliceridi:						
LLL (%)	0,045	n.s.	0,008	n.s.	0,050	n.s.
OLL_n+P_oP_oL (%)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	n.s.
PLL_n (%)	0,002	n.s.	0,000	0,003	0,003	0,005
OLL (%)	0,000	0,039	n.s.	0,018	n.s.	n.s.
OOL_n+P_oOL+PLL (%)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	n.s.
POL_n (%)	0,000	0,000	0,002	n.s.	n.s.	n.s.
E_eOL (%)	n.s.	n.s.	0,000	n.s.	n.s.	0,000
OOL+P_oOO (%)	0,000	0,007	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POL+P_oPO (%)	n.s.	n.s.	0,051	n.s.	n.s.	n.s.
PPL (%)	n.s.	0,000	0,001	n.s.	n.s.	0,014
E_eOO (%)	n.s.	0,001	0,004	n.s.	0,002	n.s.
E_eOP (%)	n.s.	0,000	n.s.	0,011	n.s.	n.s.
OOO (%)	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POO+SOL (%)	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PPO+PSL (%)	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E_aOO (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E_cOO (%)	0,011	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SOO (%)	0,000	n.s.	0,001	n.s.	n.s.	n.s.
PSO (%)	0,000	n.s.	0,003	n.s.	n.s.	n.s.
AOO (%)	0,000	0,000	0,009	n.s.	n.s.	0,013
SSO (%)	n.s.	0,001	0,047	n.s.	n.s.	0,020
Alcoli alifatici:						
docosanolo C₂₂-OH (ppm)	0,000	n.s.	0,011	0,014	n.s.	0,013
tricosanolo C₂₃-OH (ppm)	0,000	0,051	0,022	n.s.	n.s.	n.s.
tetracosanolo C₂₄-OH (ppm)	0,000	0,017	0,052	0,001	0,016	n.s.
pentacosanolo C₂₅-OH (ppm)	0,013	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
esacosanolo C₂₆-OH (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,047
eptacosanolo C₂₇-OH (ppm)	n.s.	0,015	n.s.	n.s.	n.s.	0,025
ottacosanolo C₂₈-OH (ppm)	0,033	n.s.	0,020	n.s.	n.s.	0,017
totali (ppm)	0,000	n.s.	n.s.	0,029	n.s.	0,035
Alcoli triterpenici:						
tirucallolo (ppm)	n.s.	0,045	0,005	n.s.	n.s.	n.s.
dammaradienolo (ppm)	0,017	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
β-amirina (ppm)	n.s.	0,000	0,042	0,047	0,055	0,004
butirospermolo (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,049	n.s.	n.s.
α-amirina (ppm)	0,025	n.s.	0,012	n.s.	n.s.	0,010
cicloartenolo (ppm)	n.s.	n.s.	0,050	n.s.	n.s.	n.s.
24-metilencicloartanolo (ppm)	0,051	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
citrostadienolo (ppm)	0,002	n.s.	0,010	n.s.	n.s.	0,017
ciclobranolo (ppm)	n.s.	0,003	n.s.	n.s.	n.s.	0,019
totali (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,045

(continua pagina successiva)

(segue pagina precedente)

VARIABILE (unità di misura)	CULTIVAR	ANNI	SITI	CV x ANNI	CV x SITI	ANNI x SITI
Steroli: colesterolo (%)	0,006	0,016	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
brassicasterolo (%)	0,023	0,022	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
24-metilcolesterolo (%)	0,027	n.s.	n.s.	n.s.	0,052	n.s.
campesterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
campestanolo (%)	n.s.	0,037	n.s.	n.s.	n.s.	0,025
stigmasterolo (%)	0,000	0,005	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 7-campesterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 5,23-stigmastadienolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
cleroasterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
β -sitosterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
sitostanolo (%)	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 5-avenasterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 5,24-stigmastadienolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 7-stigmasterolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Δ 7-avenasterolo (%)	0,005	0,035	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
eritrodiole+uvaolo (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
totali (ppm)	0,028	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Polifenoli: idrossitirosolo (ppm)	n.s.	0,000	0,025	n.s.	n.s.	n.s.
tirosolo (ppm)	n.s.	0,021	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
vanillico (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
totali (ppm)	0,000	0,000	0,012	n.s.	n.s.	0,001
Tocoferoli: α tocoferolo (ppm)	0,000	0,038	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
β tocoferolo (ppm)	0,042	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
γ tocoferolo (ppm)	0,000	n.s.	n.s.	0,003	n.s.	n.s.
totali (ppm)	0,000	0,034	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pigmenti: carotenoidi totali (ppm)	n.s.	0,011	n.s.	n.s.	n.s.	-
clorofille totali (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
fitolo (ppm)	n.s.	n.s.	0,026	n.s.	n.s.	0,014
Stabilità ossidativa (giorni/kg)	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	0,002
Aromi: <i>n</i> -ottano (ppm)	n.s.	0,041	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
etil acetato (ppm)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000
2-metilbutanale (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,016	n.s.	0,007
3-metilbutanale (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,022	n.s.	0,036
etanolo (ppm)	n.s.	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pentan-3-one (ppm)	n.s.	0,000	n.s.	0,007	n.s.	n.s.
1-penten-3-one (ppm)	n.s.	0,011	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
esanale (ppm)	0,012	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2-metil-1-propanolo (ppm)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>trans</i> -2-pentenale (ppm)	n.s.	0,000	0,007	n.s.	n.s.	n.s.
1-penten-3-olo (ppm)	0,000	0,000	0,000	0,005	n.s.	n.s.
3-metil-1-butanolo (ppm)	n.s.	0,000	0,054	n.s.	n.s.	n.s.
<i>trans</i> -2-esenale (ppm)	0,043	0,000	0,026	n.s.	n.s.	n.s.
1-pentanolo (ppm)	n.s.	0,001	0,000	n.s.	n.s.	0,000
<i>cis</i> -2-penten-1-olo (ppm)	0,000	0,000	0,000	0,026	0,019	0,029
1-esanolo (ppm)	n.s.	0,004	n.s.	0,006	n.s.	n.s.
<i>cis</i> -3-esen-1-olo (ppm)	0,021	0,019	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>trans</i> -2-esenolo (ppm)	n.s.	0,000	0,005	0,000	n.s.	0,028
acido acetico (ppm)	n.s.	0,000	0,000	n.s.	0,030	0,000
1-ottanolo (ppm)	n.s.	n.s.	0,007	n.s.	0,043	n.s.
totali (ppm)	0,044	0,000	0,011	n.s.	n.s.	n.s.

- parametro non incluso nel modello

n.s. non significativo all'ANOVA ad un livello del 5%

4.4.1 – Acidi grassi

La cultivar Casaliva mostra un profilo in acidi grassi nella media; Frantoio si differenzia per alti contenuti di miristico, eptadecanoico, eptadecenoico e behenico; Leccino per elevati livelli di palmitico e palmitoleico, e scarsi di linoleico ed eicosenoico; Pendolino è caratterizzato da bassi valori di eptadecanoico, stearico ed arachico, ed un alto valore di linolenico (tabella 31).

L'anno 1998 si è caratterizzato per alti contenuti di eptadecenoico e bassi contenuti di linolenico; l'anno 1999 per bassi valori di behenico e lignocericico; l'anno 2000 ha alti valori di palmitico e linolenico; infine l'anno 2001 presenta una composizione acidica nella media (tabella 31).

I contenuti in acido oleico e lignocericico non sono risultati significativi per differenziare le cultivar; mentre miristico, palmitoleico, eptadecanoico, stearico ed eicosenoico non danno differenze significative tra gli anni.

Tabella 31 – Acidi grassi: composizione per le cultivar e gli anni (%).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
M – miristico C _{14:0}	0,01a ¹	0,12b	0,04a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a
P – palmitico C _{16:0}	11,50a	11,10a	13,59c	12,19b	11,83a	12,50b	13,00c	11,78a
P_o – palmitoleico C _{16:1}	0,81a	0,78a	1,23c	0,94b	1,00a	1,00a	0,98a	0,88a
E_a – eptadecanoico C _{17:0}	0,04b	0,06c	0,04b	0,03a	0,04a	0,04a	0,04a	0,04a
E_e – eptadecenoico C _{17:1}	0,09a	0,34b	0,11a	0,10a	0,16b	0,09a	0,09a	0,10a
S – stearico C _{18:0}	1,61b	1,64b	1,66b	1,25a	1,55a	1,65a	1,55a	1,68a
O – oleico C _{18:1}	78,82a	78,84a	77,71a	78,38a	79,37b	77,96a	77,36a	79,23b
L – linoleico C _{18:2}	5,73b	5,52b	4,36a	5,50b	4,71a	5,44b	5,47b	4,79a
L_n – linolenico C _{18:3}	0,61a	0,65b	0,61a	0,98c	0,58a	0,67b	0,73c	0,69b
A – arachico C _{20:0}	0,31c	0,32c	0,28b	0,21a	0,27a	0,27a	0,30b	0,32b
E_c – eicosenoico C _{20:1}	0,33c	0,34c	0,27a	0,31b	0,28a	0,29a	0,33a	0,33a
B – behenico C _{22:0}	0,10b	0,27c	0,08a	0,08a	0,11b	0,08a	0,10b	0,10b
L_g – lignocericico C _{24:0}	0,03a	0,02a	0,02a	0,02a	0,03b	0,00a	0,04b	0,04b

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Le cultivar Casaliva e Frantoio, simili sulla base della composizione acidica, si separano bene da Leccino e da Pendolino in base alla combinazione lineare dei livelli degli acidi grassi eptadecenoico, linolenico, eicosenoico e behenico per la prima funzione, e palmitico, linoleico e linolenico per la seconda funzione (tabelle 32 e 33, figura 21).

Gli anni sono separati solo in base agli acidi grassi oleico, eicosenoico e lignocericico (tabelle 32 e 33, figura 21).

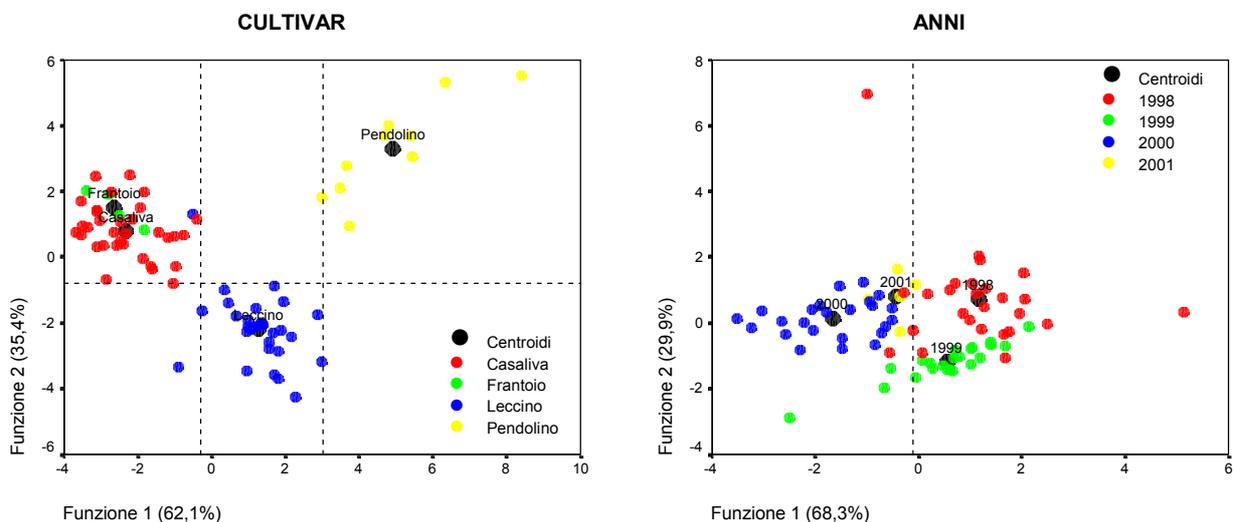
Tabella 32 – Acidi grassi: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	6,770	62,1	62,1	0,933	0,021	273,2	21	0,000
	2	3,858	35,4	97,5	0,891	0,161	128,6	12	0,000
	3	0,276	2,5	100,0	0,465	0,784	17,2	5	0,004
ANNI	1	1,501	68,3	68,3	0,775	0,232	105,2	12	0,000
	2	0,657	29,9	98,2	0,630	0,580	39,2	6	0,000
	3	0,040	1,8	100,0	0,197	0,961	2,9	2	0,240

Tabella 33 – Acidi grassi: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Palmitico C_{16:0}	0,443	-0,834	0,166	Miristico C_{14:0}	0,507	0,101	-0,512
Eptadecenoico C_{17:1}	1,334	0,124	-0,237	Oleico C_{18:1}	0,823	0,532	0,502
Linoleico C_{18:2}	-0,360	0,672	-0,172	Eicosenoico C_{20:1}	-0,651	-0,226	0,446
Linolenico C_{18:3}	1,197	0,625	0,026	Lignocericico C_{24:0}	-0,610	0,820	-0,119
Arachico C_{20:0}	-0,499	-0,360	-0,115				
Eicosenoico C_{20:1}	-0,708	0,168	0,085				
Behenico C_{22:0}	-1,213	0,052	1,212				

Figura 21 – Acidi grassi: punteggi delle prime funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.



4.4.2 – Trigliceridi

Le cultivar Casaliva e Frantoio sono caratterizzate da una composizione trigliceridica simile e nella media, anche se Frantoio si evidenzia per un basso contenuto in POO+SOL ed uno alto in SOO; Leccino si caratterizza per bassi valori di OLL_n+P_oP_oL, OLL, OOL_n+P_oOL+PLL, OOL+P_oOO e E_cOO, e per alti valori di POO+SOL e PPO+PSL; infine Pendolino possiede molto OLL_n+P_oP_oL, PLL_n, OOL_n+P_oOL+PLL e POL_n, e poco SOO e PSO (tabella 34).

Gli anni risultano così caratterizzati: il 1998 si differenzia molto dalle altre annate a causa di una composizione trigliceridica con molti valori bassi; il 1999 per un valore alto in E_eOO; il 2000 per valori alti in OLL e POL_n; ed il 2001 per un valore alto in SSO (tabella 34).

Il contenuto in trigliceridi LLL, E_eOL, POL+P_oPO, PPL, E_eOO, E_eOP, OOO, E_aOO e SSO non è risultato utile per differenziare le cultivar; mentre quello di LLL, PLL_n, E_eOL, POL+P_oPO, POO+SOL, PPO+PSL, E_aOO, SOO e PSO non lo è stato per differenziare gli anni (tabella 34).

Tabella 34 – Trigliceridi: composizione per le cultivar e gli anni (%).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
LLL	0,03a ¹	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a
OLL _n +P _o P _o L	0,14b	0,15b	0,12a	0,22c	0,09a	0,17c	0,17c	0,14b
PLL _n	0,05a	0,06a	0,06a	0,08b	0,06a	0,06a	0,05a	0,04a
OLL	0,85b	0,80b	0,53a	0,78b	0,67a	0,74ab	0,75b	0,67ab
OOL _n +P _o OL+PLL	1,50b	1,49b	1,35a	2,04c	1,28a	1,64c	1,63c	1,53b
POL _n	0,51a	0,53a	0,63b	0,80c	0,48a	0,64bc	0,67c	0,61b
E _e OL	0,06a	0,06a	0,07a	0,08a	0,05a	0,08a	0,08a	0,06a
OOL+P _o OO	11,14b	10,67b	8,31a	10,72b	8,99a	10,48c	10,60c	9,60b
POL+P _o PO	4,95a	4,64a	5,40a	5,09a	5,41a	5,06a	5,09a	4,16a
PPL	0,26a	0,26a	0,31a	0,35a	0,06a	0,43c	0,41c	0,29b
E _e OO	0,18a	0,20a	0,18a	0,17a	0,13a	0,25c	0,17b	0,17b
E _e OP	0,07a	0,09a	0,08a	0,07a	0,06a	0,09b	0,08b	0,09b
OOO	48,48a	49,38a	46,13a	47,54a	49,85b	45,83a	45,99a	49,72b
POO+SOL	23,55ab	23,34a	27,53c	24,49b	24,87a	25,34a	25,68a	24,23a
PPO+PSL	2,74a	2,65a	3,94c	3,14b	3,08a	3,33a	3,44a	2,93a
E _a OO	0,08a	0,08a	0,08a	0,06a	0,06a	0,10a	0,07a	0,07a
E _c OO	0,64b	0,63b	0,51a	0,60b	0,46a	0,66b	0,64b	0,68b
SOO	3,45bc	3,54c	3,36b	2,64a	3,31a	3,50a	3,10a	3,53a
PSO	0,69b	0,70b	0,85c	0,58a	0,70a	0,80a	0,73a	0,71a
AOO	0,51b	0,55b	0,39a	0,42a	0,27a	0,61c	0,48b	0,58c
SSO	0,12a	0,15a	0,12a	0,10a	0,07a	0,18d	0,11b	0,14c

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Le cultivar Casaliva e Frantoio, aventi una composizione trigliceridica simile, sono distinte da Leccino e Pendolino in base ai rapporti tra i seguenti trigliceridi: OLL, POL+P_oPO, PPL, OOO e PPO+PSL per la funzione 1; e OOL_n+P_oOL+PLL, OOO e PPO+PSL per la funzione 2 (tabelle 35 e 36, e figura 22).

Gli anni sono separati solo dal rapporto tra PPL e AOO dalla prima funzione, che è in grado di separare l'anno 1998 dai rimanenti, a causa di una composizione trigliceridica mediamente bassa (tabelle 35 e 36, e figura 22).

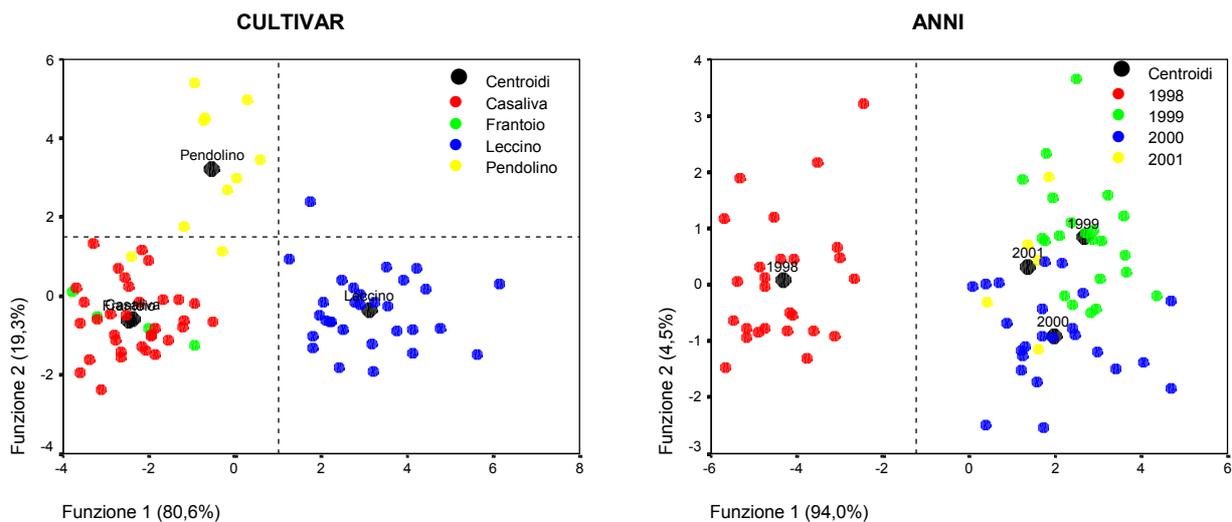
Tabella 35 – Trigliceridi: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	6,925	80,6	80,6	0,935	0,047	217,2	18	0,000
	2	1,658	19,3	99,9	0,790	0,372	70,2	10	0,000
	3	0,011	0,1	100,0	0,105	0,989	0,8	4	0,940
ANNI	1	10,227	94,0	94,0	0,954	0,052	211,9	15	0,000
	2	0,495	4,5	98,6	0,575	0,579	39,0	8	0,000
	3	0,155	1,4	100,0	0,366	0,866	10,3	3	0,016

Tabella 36 – Trigliceridi: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
OLL	-1,025	0,230	0,254	POL+P _o PO	-0,443	-0,060	0,832
OOL _n +P _o OL+PLL	-0,028	1,423	-0,074	PPL	1,125	-0,487	0,109
POL+P _o PO	1,455	0,270	-0,658	E _e OO	-0,243	0,687	0,243
PPL	1,111	-0,360	0,538	AOO	0,549	-0,053	-0,129
OOO	1,774	1,397	1,266	SSO	0,042	0,754	0,004
PPO+PSL	1,235	0,943	0,623				

Figura 22 – Trigliceridi: punteggi delle prime funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.



4.4.3 – Alcoli alifatici

La composizione in alcoli alifatici in Casaliva e Frantoio è molto simile, solo il docosanol è presente in minima quantità nella cultivar Frantoio; Leccino mostra un contenuto medio con un alto valore in ottacosanol, infine Pendolino presenta una composizione alta in: docosanol, tricosanol, tetracosanol, pentacosanol ed alcoli alifatici totali (tabella 37).

Gli anni non sono molto differenziabili, solo il 1998 si separa leggermente dagli altri a causa di un contenuto in alcoli alifatici nella media; il 1999 presenta elevati valori in tricosanol, tetracosanol ed eptacosanol; il 2000 presenta un basso contenuto in eptacosanol; ed il 2001 poco tricosanol e tetracosanol (tabella 37).

L'analisi della varianza ha rivelato che i contenuti in esacosanol ed eptacosanol non sono significativi per differenziare le cultivar, e che docosanol, pentacosanol, esacosanol, ottacosanol ed alcoli alifatici totali non sono utili per separare gli anni (tabella 37).

Tabella 37 – Alcoli alifatici: composizione media per le cultivar e gli anni (ppm).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
Docosanol C ₂₂ -OH	12,78b ¹	9,94 a	13,77b	25,83 c	15,00a	16,16a	14,91a	6,00a
Tricosanol C ₂₃ -OH	1,29a	1,12a	1,93b	2,53 c	1,49b	2,12 c	1,66b	0,97 a
Tetracosanol C ₂₄ -OH	21,19a	19,28a	29,49b	68,72 c	25,08b	40,67 d	30,75c	12,71 a
Pentacosanol C ₂₅ -OH	3,01a	3,23a	2,86a	4,20 b	2,56a	3,86a	3,18a	2,48a
Esacosanol C ₂₆ -OH	36,01a	39,09a	36,16a	45,23a	32,43a	49,22a	33,34a	31,19a
Eptacosanol C ₂₇ -OH	2,13a	2,59a	2,33a	2,20a	2,41bc	2,56 c	1,78 a	2,15b
Ottacosanol C ₂₈ -OH	11,96a	13,23a	16,95 b	13,65a	14,69a	16,77a	11,77a	11,82a
Alcoli alifatici totali	88,4a	88,5a	103,5b	162,4 c	93,7a	131,4a	97,4a	67,31a

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Le cultivar Leccino e Pendolino sono ben separate dalle cultivar Casaliva e Frantoio in base ai rapporti tra tricosanol, esacosanol ed ottacosanol nella funzione 1; ed ai rapporti tra tetracosanol ed ottacosanol nella funzione 2 (tabelle 38 e 39, e figura 23).

Gli anni non sono ben separati, solo il 1998 si distingue dagli altri in base al rapporto tra esacosanol ed eptacosanol (tabelle 38 e 39, e figura 23).

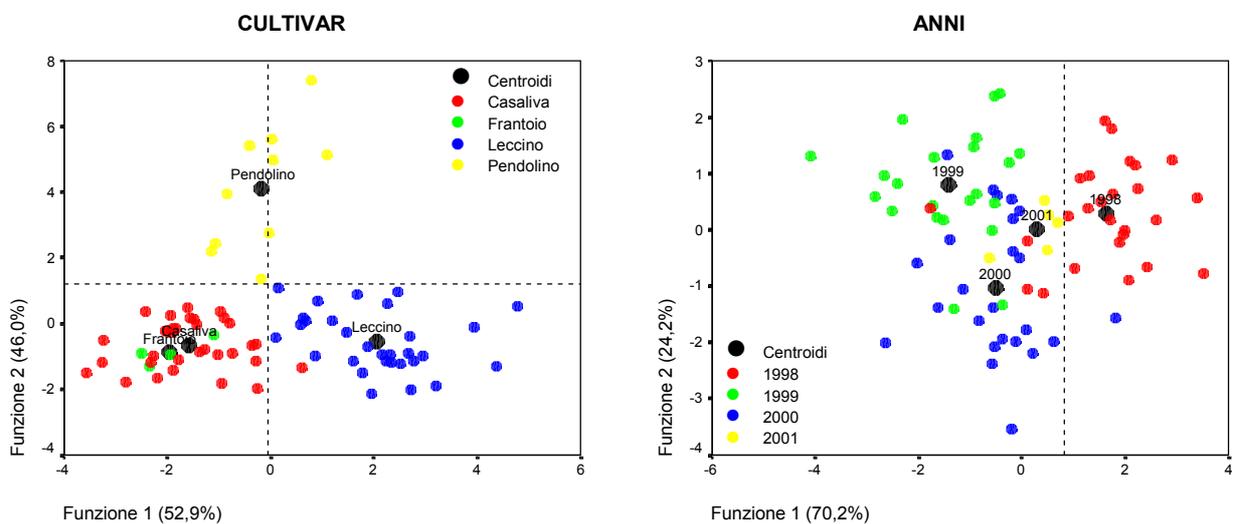
Tabella 38 – Alcoli alifatici: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	3,086	52,9	52,9	0,869	0,063	196,8	18	0,000
	2	2,681	46,0	98,9	0,853	0,256	96,9	10	0,000
	3	0,063	1,1	100,0	0,243	0,941	4,3	4	0,362
ANNI	1	1,637	70,2	70,2	0,788	0,214	110,9	12	0,000
	2	0,566	24,2	94,4	0,601	0,565	41,1	6	0,000
	3	0,130	5,6	100,0	0,339	0,885	8,8	2	0,012

Tabella 39 – Alcoli alifatici: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
C₂₂-OH	-0,637	-0,076	-0,816	C₂₂-OH	0,614	-0,018	1,057
C₂₃-OH	0,804	0,133	-0,002	C₂₅-OH	-0,180	-1,237	0,018
C₂₄-OH	0,545	1,411	0,725	C₂₆-OH	-2,006	1,243	-0,162
C₂₆-OH	-2,339	-0,450	-0,704	C₂₇-OH	1,697	0,559	0,022
C₂₇-OH	-0,701	0,552	1,640				
C₂₈-OH	2,474	-1,033	-0,608				

Figura 23 – Alcoli alifatici: punteggi delle prime funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.



4.4.4 – Alcoli triterpenici

Pochi alcoli triterpenici sono risultati significativi ai fini della caratterizzazione: dammaradienolo, α -amirina, 24-metilencicloartenolo e citrostadienolo per le cultivar; e tirucallo, β -amirina e ciclobranolo per gli anni (tabella 40).

Le cultivar Casaliva e Frantoio mostrano una composizione media e simile tra loro, con bassi valori di dammaradienolo ed alti di 24-metilencicloartanolo; Leccino si evidenzia per un alto valore in α -amirina; mentre Pendolino per un contenuto basso di α -amirina, 24-metilencicloartanolo e citrostadienolo.

Gli anni non sono ben distinti: il 1998 mostra un basso valore di β -amirina, che è molto elevato nel 1999; il 2000 presenta un basso contenuto in tirucallo; ed il 2001 poco ciclobranolo.

Tabella 40 – Alcoli triterpenici: composizione per le cultivar e gli anni (ppm).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
Tirucallo	3,83a ¹	4,58a	6,16b	4,57a	5,37b	5,18b	3,87a	5,75b
Dammaradienolo	7,00a	6,54a	12,29b	13,92b	11,09a	11,93a	7,24a	8,07a
β-amirina	27,22a	27,00a	21,96a	20,64a	14,91a	33,55c	25,20b	28,15b
Butirospermolo	30,06a	32,94a	34,49a	37,34a	33,50a	37,82a	26,63a	37,88a
α-amirina	11,63ab	12,19b	16,71c	10,08a	12,81a	14,68a	13,32a	11,75a
Cicloartenolo	81,01a	81,27a	96,56a	83,54a	85,72a	106,11a	70,97a	92,78a
24-metilencicloartanolo	274,8c	232,4c	171,9b	100,9a	216,6a	228,6a	199,2a	144,3a
Citrostadienolo	132,7b	141,1b	127,2b	52,7a	107,2a	134,9a	118,1a	139,1a
Ciclobranolo	3,63a	2,93a	4,32a	2,07a	4,32b	3,88b	3,44b	0,34a
Alcoli triterpenici totali	571,9a	541,0a	491,6a	325,7a	491,6a	576,7a	468,0a	468,1a

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Le cultivar risultano separate in base ai rapporti tra α -amirina, 24-metilencicloartanolo e citrostadienolo nella funzione 1, tra β -amirina e citrostadienolo nella funzione 2 (tabelle 41 e 42, e figura 24).

Solo l'anno 1998 è risultato separato dagli altri in base alla combinazione lineare tra β -amirina, butirrospermolo, cicloartenolo e 24-metilencicloartanolo (tabelle 41 e 42, e figura 24).

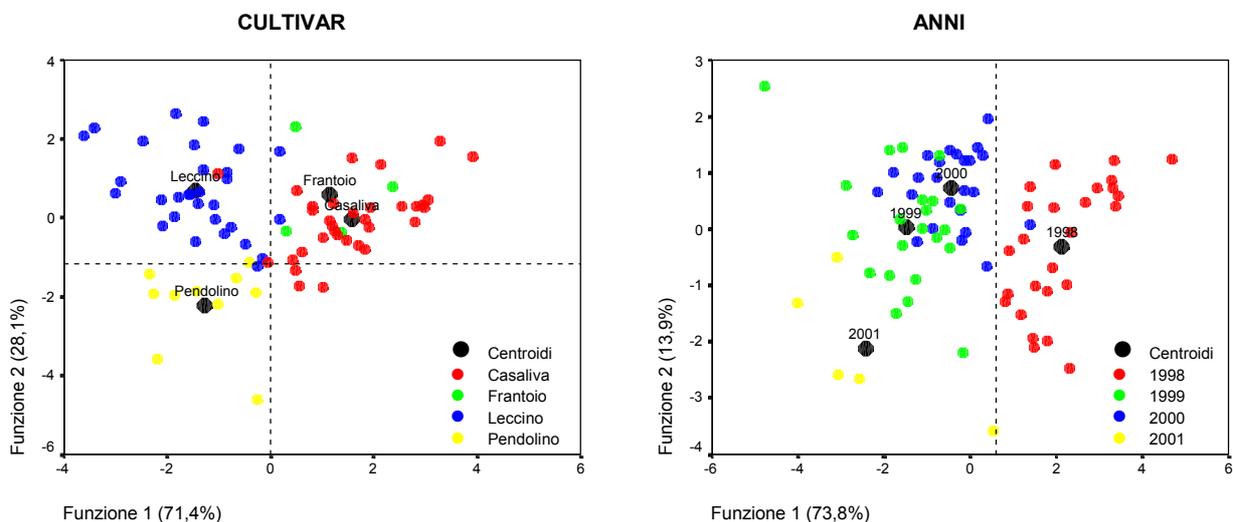
Tabella 41 – Alcoli triterpenici: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	2,249	71,4	71,4	0,832	0,161	131,7	12	0,000
	2	0,885	28,1	99,5	0,685	0,521	46,9	6	0,000
	3	0,017	0,5	100,0	0,130	0,983	1,2	2	0,540
ANNI	1	2,761	73,8	73,8	0,857	0,120	149,6	21	0,000
	2	0,521	13,9	87,7	0,585	0,450	56,2	12	0,000
	3	0,460	12,3	100,0	0,561	0,685	26,7	5	0,000

Tabella 42 – Alcoli triterpenici: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
β -amirina	0,352	-1,132	-0,201	β -amirina	-1,510	0,835	0,190
α -amirina	-1,646	-0,082	0,822	Butirrospirmolo	1,157	0,037	-1,378
24-metilencicloartanolo	0,824	-0,456	1,004	α -amirina	0,294	1,454	-0,832
Citrostadienolo	0,776	1,872	-0,998	Cicloartenolo	-0,835	-1,320	2,466
				24-metilencicloartanolo	1,150	0,891	0,114
				Citrostadienolo	-0,411	-1,884	-0,828
				Ciclobranolo	0,772	0,373	0,690

Figura 24 – Alcoli triterpenici: punteggi delle prime funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.



4.4.5 – Steroli

Solo alcuni steroli (oltre al loro contenuto totale) sono risultati significativi per distinguere le cultivar e gli anni (tabella 43).

La composizione sterolica di Casaliva e Frantoio è simile e si presenta spesso con valori bassi, Leccino di distingue per il contenuto alto in stigmasterolo, mentre Pendolino per elevati valori in colesterolo, brassicasterolo, 24-metilcolesterolo e sitosterolo e per un basso contenuto in steroli totali.

Gli anni si sono così differenziati: il 1998 presenta un alto valore in campestanolo ed uno basso in steroli totali; il 1999 mostra valori elevati in stigmasterolo e Δ 7-avenasterolo; il 2000 mostra una composizione sterolica nella media; ed infine il 2001 presenta bassi valori in colesterolo, campestanolo e stigmasterolo, ed uno alto in steroli totali.

Tabella 43 – Steroli: composizione per le cultivar e gli anni (steroli singoli in % e steroli totali in ppm).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
Colesterolo	0,24a ¹	0,22a	0,32b	0,43c	0,33b	0,27b	0,31b	0,10a
Brassicasterolo	0,03ab	0,02a	0,03b	0,05c	0,04b	0,02a	0,05b	0,01a
24-metilcolesterolo	0,14a	0,13a	0,12a	0,20b	0,12a	0,15a	0,16a	0,08a
Campesterolo	3,06a	3,16a	3,02a	2,83a	3,11a	2,97a	2,96a	3,08a
Campestanolo	0,14a	0,10a	0,16a	0,17a	0,20c	0,10ab	0,15bc	0,08a
Stigmasterolo	0,59a	0,61a	1,10c	0,77b	0,75b	0,99c	0,81b	0,43a
Δ7-campesterolo	0,10a	0,02a	0,04a	0,04a	0,12a	0,03a	0,04a	0,02a
Δ5,23-stigmastadienolo	0,50a	0,42a	0,54a	0,50a	0,56a	0,43a	0,56a	0,42a
Clerosterolo	0,48a	0,42a	0,54a	0,51a	0,56a	0,43a	0,54a	0,42a
β-sitosterolo	80,31a	83,70a	80,09a	81,49a	79,77a	80,85a	80,26a	84,80a
Sitostanolo	1,01a	1,14a	1,11a	1,74b	1,10a	1,15a	1,27a	0,87a
Δ5-avenasterolo	12,18a	9,24a	11,61a	10,15a	12,27a	11,34a	11,55a	8,63a
Δ5,24-stigmastadienolo	0,75a	0,43a	0,63a	0,64a	0,59a	0,66a	0,80a	0,58a
Δ7-stigmasterolo	0,15a	0,15a	0,20a	0,15a	0,16a	0,17a	0,19a	0,12a
Δ7-avenasterolo	0,32a	0,26a	0,48a	0,31a	0,34a	0,45b	0,36a	0,36a
Eritrodiolo+uvaolo	0,55a	0,61a	0,57a	0,81b	0,44a	0,81a	0,58a	0,56a
Steroli totali	1247b	1237b	1216b	1047a	1076a	1330c	1193b	1440d

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Casaliva e Frantoio risultano separate da Leccino e Pendolino in base al rapporto tra stigmasterolo e Δ 5,24-stigmastadienolo nella funzione 1 e tra sitostanolo ed eritrodiolo+uvaolo nella funzione 2 (tabelle 44 e 45, e figura 25).

Gli anni sono solo leggermente separati in base al rapporto tra brassicasterolo e β -sitosterolo (tabelle 44 e 45, e figura 25).

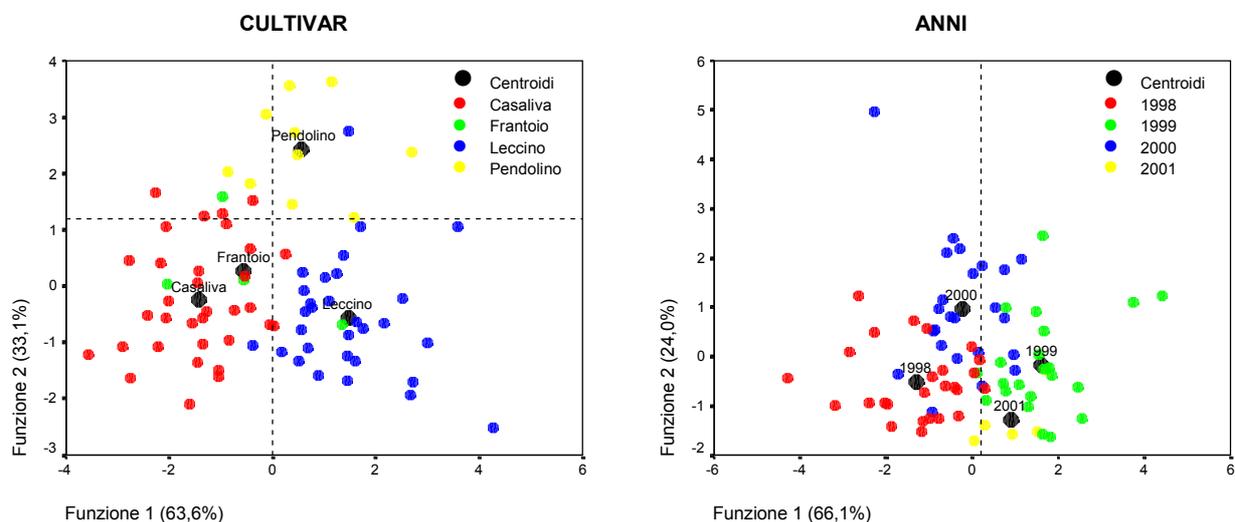
Tabella 44 – Steroli: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	1,859	63,6	63,6	0,806	0,162	130,1	15	0,000
	2	0,967	33,1	96,7	0,701	0,463	55,0	8	0,000
	3	0,097	3,3	100,0	0,297	0,912	6,6	3	0,085
ANNI	1	1,464	66,1	66,1	0,771	0,218	108,3	18	0,000
	2	0,530	24,0	90,1	0,589	0,536	44,3	10	0,000
	3	0,219	9,9	100,0	0,424	0,820	14,1	4	0,007

Tabella 45 – Steroli: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Colesterolo	0,409	0,470	0,331	Brassicasterolo	-0,789	0,611	0,006
Stigmasterolo	1,043	-0,455	0,098	24-metilencolesterolo	0,633	0,569	0,078
Sitostanolo	0,229	0,707	-0,106	Stigmasterolo	0,635	0,262	-0,518
Δ5,24-stigmastadienolo	-0,560	-0,151	0,880	β-sitosterolo	1,008	0,389	0,744
Eritrodiolo+uvaolo	-0,334	0,593	0,093	Δ5,24-stigmastadienolo	0,562	0,616	0,445
				Eritrodiolo+uvaolo	0,673	-0,006	-0,131

Figura 25 – Steroli: punteggi delle prime funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.



4.4.6 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti e stabilità ossidativa

La cultivar Casaliva si caratterizza per un alto contenuto in polifenoli totali ed un basso valore in β tocoferolo; Frantoio presenta un contenuto in polifenoli e tocoferoli mediamente basso; Leccino ha un valore basso in polifenoli totali, ed alti in α tocoferolo, γ tocoferolo e tocoferoli totali; Pendolino ha un contenuto in polifenoli e tocoferoli nella media (tabella 46).

Il 1998 si distingue per il basso contenuto in α tocoferolo e in tocoferoli totali, il 1999 per una composizione in polifenoli e tocoferolo nella media, il 2000 presenta valori alti in idrossitirosolo, tirosolo, α tocoferolo e tocoferoli totali ed un basso contenuto in carotenoidi, che risultano più elevati nel 2001 (tabella 46).

Tabella 46 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti: composizione per le cultivar ed gli anni (ppm).

Stabilità ossidativa: valore per le cultivar e gli anni (giorni/kg).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
Idrossitirosolo	1,33 a ¹	1,19a	0,91a	0,94 a	0,75a	0,35a	2,13c	1,57b
Tirosolo	2,99a	1,95a	3,88a	2,02a	2,72a	2,56a	4,32b	2,52a
Vanillico	2,85a	4,65a	3,36a	1,44a	-	-	2,51a	4,91a
Polifenoli totali	256,6c	175,7ab	150,6a	181,5b	152,1a	161,9a	276,2b	296,9b
α tocoferolo	122,7a	139,6a	260,4c	230,5b	167,6a	191,9b	216,8c	188,4b
β tocoferolo	1,29a	2,41b	2,59b	2,36b	1,38a	2,36a	2,14a	2,90a
γ tocoferolo	1,23a	1,40a	8,42c	4,42b	3,94a	4,41a	5,33a	3,17a
Tocopheroli totali	125,2a	143,4a	271,4c	237,3b	172,9a	198,7b	224,2c	194,5b
Carotenoidi totali	3,96a	7,03a	3,40a	3,66a	-	-	3,12a	7,86b
Clorofille totali	4,82a	7,06a	2,86a	3,20a	-	-	3,28a	7,93a
Fitolo	160,3a	168,0a	172,9a	134,5a	144,5a	173,1a	167,9a	179,4a
Stabilità ossidativa	106,2a	88,1a	126,0a	103,5a	126,3a	104,1a	104,4a	118,7a

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05
- variabili non disponibili

L'analisi discriminante è stata effettuata solo sui polifenoli e tocoferoli, perché sono risultati significativamente diversi all'ANOVA.

Casaliva e Frantoio si separano dalle altre cultivar in base ai rapporti tra polifenoli totali, α tocoferolo e γ tocoferolo (tabelle 47 e 48, figura 26).

Gli anni 1998 e 1999 vengono separati dagli altri per i rapporti tra idrossitirosolo, polifenoli totali e β tocoferolo (tabelle 47 e 48, figura 26).

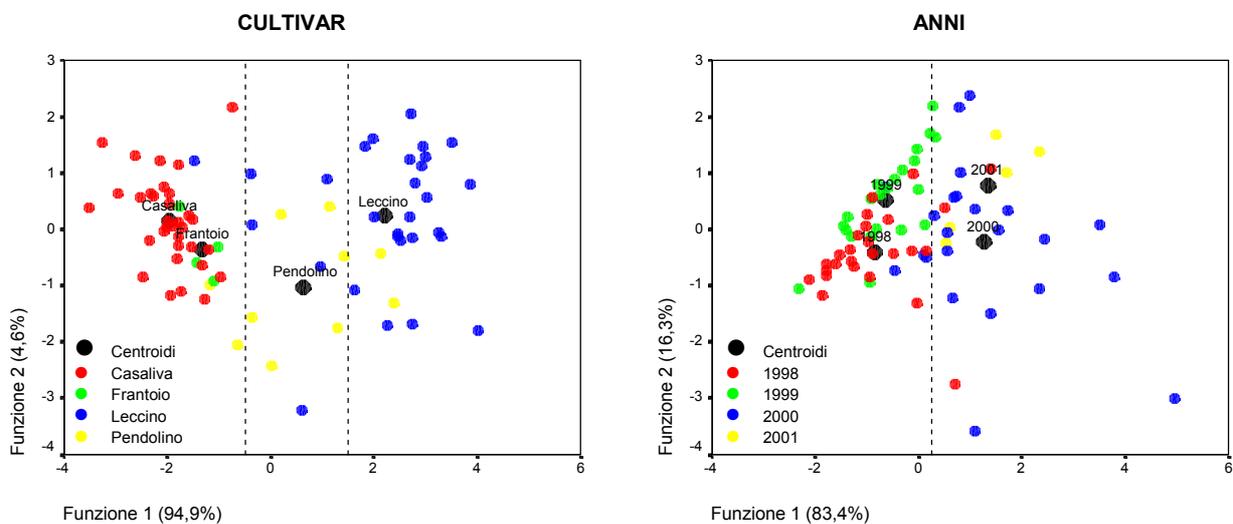
Tabella 47 – Polifenoli e tocoferoli: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	3,870	94,9	94,9	0,891	0,169	127,0	9	0,000
	2	0,188	4,6	99,5	0,398	0,825	13,8	4	0,008
	3	0,020	0,5	100,0	0,142	0,980	1,5	1	0,228
ANNI	1	1,013	83,4	83,4	0,709	0,413	63,2	9	0,000
	2	0,198	16,3	99,7	0,407	0,832	13,2	4	0,011
	3	0,003	0,3	100,0	0,057	0,997	0,2	1	0,627

Tabella 48 – Polifenoli e tocoferoli: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Polifenoli totali	-0,447	0,213	0,897	Idrossitirosole	0,652	-0,719	0,553
α tocoferolo	0,570	-1,069	0,300	Polifenoli totali	0,592	0,605	-0,791
γ tocoferolo	0,542	1,105	-0,018	β tocoferolo	0,580	0,736	0,540

Figura 26 – Polifenoli e tocoferoli: punteggi delle prime funzioni canoniche per le cultivar e per gli anni.



4.4.7 – Composti volatili

Solo 6 composti volatili sono risultati significativi per distinguere le cultivar: etil acetato, esanale, 1-penten-3-olo, *trans*-2-esenale, *cis*-2-penten-1-olo e *cis*-3-esen-1-olo; mentre per distinguere gli anni solamente 4 sostanze aromatiche non sono risultate significative: 2-metilbutanale, 3-metilbutanale, 2-metil-1-propanolo ed 1-ottanolo (tabella 49).

Le cultivar si caratterizzano per la presenza di contenuti massimi e/o minimi di alcuni composti volatili: Casaliva possiede poco etil acetato; Frantoio contenuti elevati in etil acetato, esanale, 1-penten-3-olo, *trans*-2-esenale, *cis*-2-penten-1-olo ed aromi totali; Leccino valori bassi in esanale, *trans*-2-esenale ed aromi totali; infine Pendolino è caratterizzato da un alto contenuto in *cis*-3-esen-1-olo.

Gli anni sono anch'essi separabili in base al contenuto in sostanze aromatiche: il 1998 è caratterizzato per avere bassi contenuti in composti volatili; mentre il 1999 ed il 2001 sono caratterizzati per averne molti; ed infine il 2000 ha molto *n*-ottano, e poco etanolo ed 1-esanolo.

Tabella 49 – Composti volatili: composizione per le cultivar e gli anni.

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
<i>n</i> -ottano (ppm)	7,29a ¹	9,38a	6,38a	5,43a	2,77a	6,14a	12,88b	1,52a
Etil acetato (ppm)	7,17a	16,12c	9,30b	7,60ab	1,57a	20,45d	5,35b	7,39c
2-metilbutanale (ppm)	2,30a	1,58a	4,44a	2,88a	0,96a	5,35a	3,67a	2,73a
3-metilbutanale (ppm)	3,25a	2,31a	7,59a	3,70a	1,76a	7,98a	5,88a	3,75a
Etanolo (ppm)	18,58a	20,32a	23,18a	20,24a	19,89c	41,08d	4,56a	12,38b
Pentan-3-one (ppm)	16,26a	36,92a	21,04a	23,82a	15,53a	34,36b	13,26a	15,13a
1-penten-3-one (ppm)	9,10a	8,27a	10,31a	12,72a	7,06a	10,16b	12,53c	12,45c
Esanale (ppm)	39,88b	71,96c	23,27a	47,11b	10,26a	57,79c	42,57b	42,65b
2-metil-1-propanolo (ppm)	0,55a	0,59a	0,87a	0,74a	0,31a	1,01a	0,87a	0,63a
<i>trans</i> -2-pentenale (ppm)	5,97a	7,48a	5,39a	7,42a	0,39a	9,27bc	8,23b	10,28c
1-penten-3-olo (ppm)	28,11b	35,72c	16,31a	17,44a	8,75a	31,06c	23,49b	51,94d
3-metil-1-butanolo (ppm)	6,93a	9,16a	6,39a	7,24a	3,59a	6,08b	9,94c	12,73d
<i>trans</i> -2-esenale (ppm)	922,7b	1112,4c	678,0a	916,2b	242,5a	972,9b	1203,5c	1561,9d
1-pentanolo (ppm)	1,09a	1,41a	0,40a	0,36a	0,16a	1,50c	0,58b	1,20c
<i>cis</i> -2-penten-1-olo (ppm)	17,63b	20,37c	10,83a	12,33a	6,90a	19,50c	14,68b	30,11d
1-esanolo (ppm)	15,14a	26,41a	14,11a	22,41a	19,98bc	24,36c	5,41a	13,49b
<i>cis</i> -3-esen-1-olo (ppm)	13,39a	13,12a	9,29a	31,08b	5,28a	18,63b	15,08b	34,94c
<i>trans</i> -2-esenolo (ppm)	42,30a	55,38a	53,76a	100,35a	31,04a	102,70b	39,66a	43,13a
Acido acetico (ppm)	0,68a	0,38a	0,61a	0,49a	0,34a	0,85c	0,74b	0,31a
1-ottanolo (ppm)	0,82a	0,48a	1,07a	1,16a	0,65a	1,25a	1,07a	0,51a
Aromi totali (ppm)	1159b	1450c	903a	1241b	380a	1372b	1424b	1859c

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

Le cultivar non risultano essere ben separate tra loro, solo le cultivar Casaliva e Frantoio si distinguono da Leccino e Pendolino, in base alla combinazione lineare tra 2-metilbutanale, 3-metilbutanale ed 1-penten-3-olo (tabelle 50 e 51, e figura 27).

Gli anni risultano essere ben separati in base ai rapporti tra 3-metilbutanale, etanolo, 2-metil-1-propanolo, *trans*-2-pentenale e 3-metil-1-butanolo nella la funzione 1, e tra etanolo, esanale, *trans*-2-pentenale e 3-metil-1-butanolo nella funzione 2 (tabelle 50 e 51, e figura 27).

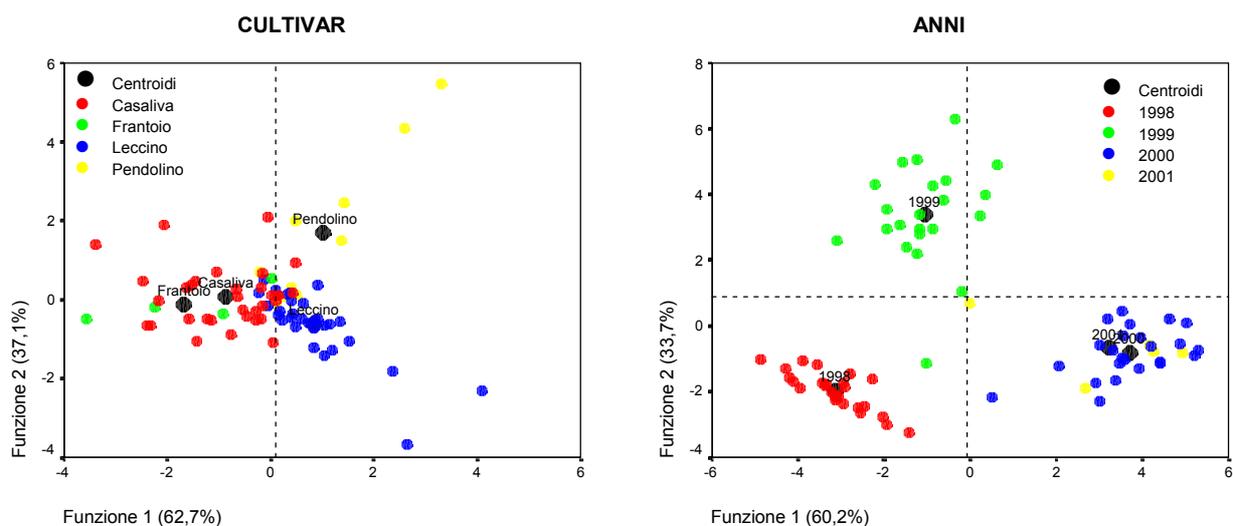
Tabella 50 – Composti volatili: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	0,939	62,7	62,7	0,696	0,330	79,7	12	0,000
	2	0,555	37,1	99,8	0,597	0,641	32,1	6	0,000
	3	0,004	0,2	100,0	0,060	0,996	0,3	2	0,878
ANNI	1	9,037	60,2	60,2	0,949	0,009	333,0	24	0,000
	2	5,064	33,7	93,9	0,914	0,086	171,5	14	0,000
	3	0,912	6,1	100,0	0,691	0,523	45,4	6	0,000

Tabella 51 – Composti volatili: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
2-metilbutanale	-1,454	2,230	-2,647	3-metilbutanale	0,615	0,078	0,458
3-metilbutanale	2,161	-2,397	2,448	Etanolo	-1,115	0,558	-0,259
1-penten-3-olo	-1,229	-0,342	0,427	Esanale	0,127	0,551	0,786
<i>cis</i> -3-esen-1-olo	0,738	0,928	0,414	2-metil-1-propanolo	0,569	0,237	0,137
				<i>trans</i> -2-pentenale	0,550	0,686	0,246
				1-penten-3-olo	-0,043	-0,136	-1,164
				3-metil-1-butanolo	0,537	-0,558	-0,302
				1-pentanolo	0,426	0,223	0,244

Figura 27 – Composti volatili: punteggi delle prime funzioni canoniche per le cultivar e per gli anni.



4.4.8 – Variabili chemiometriche caratterizzanti

I coefficienti più rappresentativi delle funzioni discriminanti sono indicati nella tabella 52 (valori in grassetto).

La composizione in acidi grassi è risultata utile per distinguere le cultivar Casaliva e Frantoio da Leccino e Pendolino in base ai livelli ed ai rapporti tra gli acidi grassi: palmitico, eptadecenoico, linoleico, linolenico, eicosenoico e behenico. Il contenuto acidico, inoltre, è servito per separare parzialmente le annate, in quanto gli acidi grassi sono maggiormente legati al fattore genetico (cultivar) e meno alle condizioni ambientali. Solo i rapporti tra gli acidi oleico, eicosenoico e behenico sono risultati utili ai fini della caratterizzazione.

I trigliceridi utili ai fini di separare le cultivar sono: OLL, $OOL_n + P_oOL + PLL$, $POL + P_oPO$, PPL, OOO, PPO+PSL. Per gli anni sono risultati utili: PPL e AOO.

Le cultivar sono separate principalmente dai seguenti alcoli alifatici: tricosanolo, tetracosanolo, esacosanolo ed ottacosanolo. Gli anni, invece, sono poco separabili in base al rapporto tra esacosanolo ed eptacosanolo.

Gli alcoli triterpenici: β -amirina, α -amirina, 24-metilencicloartanolo e citrostadienolo separano le cultivar; mentre β -amirina, butirrospermolo, cicloartenolo e 24-metilencicloartanolo separano in parte il 1998 dalle altre annate.

Gli steroli utili ai fini della caratterizzazione sono: per le cultivar, stigmasterolo, sitostanolo, $\Delta 5,24$ -stigmasterolo ed eritrodiole+uvaolo; per gli anni, brassicasterolo e β -sitosterolo.

I contenuti in polifenoli e tocoferoli hanno dato una sola funzione in grado di separare le cultivar e gli anni. I polifenoli totali, l' α tocoferolo ed il γ tocoferolo separano le cultivar; mentre l'idrossitirosole, i polifenoli totali ed il β tocoferolo separano gli anni.

I composti volatili, infine, risultano molto utili nella separazione degli anni e meno in quella delle cultivar, a causa della forte interazione tra i fattori climatici e la biosintesi degli aromi. Il 2-metilbutanale, il 3-metilbutanale e l'1-penten-3-olo separano parzialmente le cultivar; mentre il 3-metilbutanale, l'etanolo, l'esanoale, il 2-metil-1-propanolo, il *trans*-2-pentenale ed il 3-metil-1-butanolo separano il 1998 ed il 1999 dagli anni 2000 e 2001.

Tabella 52 – Variabili chemiometriche: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar ed gli anni.

VARIABILE	CULTIVAR		ANNI	
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 1	Funzione 2
Acidi grassi:				
M – miristico C _{14:0}	-	-	0,507	0,101
P – palmitico C _{16:0}	0,443	-0,834	-	-
P _o – palmitoleico C _{16:1}	-	-	-	-
E _a – eptadecanoico C _{17:0}	-	-	-	-
E _e – eptadecenoico C _{17:1}	1,334	0,124	-	-
S – stearico C _{18:0}	-	-	-	-
O – oleico C _{18:1}	-	-	0,823	0,532
L – linoleico C _{18:2}	-0,360	0,672	-	-
L _n – linolenico C _{18:3}	1,197	0,625	-	-
A – arachico C _{20:0}	-0,499	-0,360	-	-
E _c – eicosenoico C _{20:1}	-0,708	0,168	-0,651	-0,226
B – behenico C _{22:0}	-1,213	0,052	-	-
L _g – lignocericico C _{24:0}	-	-	-0,610	0,820
Trigliceridi:				
LLL	-	-	-	-
OLL _n +P _o P _o L	-	-	-	-
PLL _n	-	-	-	-
OLL	-1,025	0,230	-	-
OOL _n +P _o OL+PLL	-0,028	1,423	-	-
POL _n	-	-	-	-
E _a OL	-	-	-	-
OOL+P _o OO	-	-	-	-
POL+P _o PO	1,455	0,270	-0,443	-0,060
PPL	1,111	-0,360	1,125	-0,487
E _a OO	-	-	-0,243	0,687
E _a OP	-	-	-	-
OOO	1,774	1,397	-	-
POO+SOL	-	-	-	-
PPO+PSL	1,235	0,943	-	-
E _a OO	-	-	-	-
E _c OO	-	-	-	-
SOO	-	-	-	-
PSO	-	-	-	-
AOO	-	-	0,549	-0,053
SSO	-	-	0,042	0,754
Alcoli alifatici:				
docosanol C ₂₂ -OH	-0,637	-0,076	0,614	-0,018
tricosanol C ₂₃ -OH	0,804	0,133	-	-
tetracosanol C ₂₄ -OH	0,545	1,411	-	-
pentacosanol C ₂₅ -OH	-	-	-0,180	-1,237
esacosanol C ₂₆ -OH	-2,339	-0,450	-2,006	1,243
eptacosanol C ₂₇ -OH	-0,701	0,552	1,697	0,559
ottacosanol C ₂₈ -OH	2,474	-1,033	-	-
Alcoli triterpenici:				
tirucallo	-	-	-	-
dammaradienolo	-	-	-	-
β-amirina	0,352	-1,132	-1,510	0,835
butirospermolo	-	-	1,157	0,037
α-amirina	-1,646	-0,082	0,294	1,454
cicloartenolo	-	-	-0,835	-1,320
24-metilencicloartanol	0,824	-0,456	1,150	0,891
citrostadienolo	0,776	1,872	-0,411	-1,884
ciclobranolo	-	-	0,772	0,373

(continua pagina successiva)

(segue pagina precedente)

VARIABILE	CULTIVAR		ANNI	
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 1	Funzione 2
Steroli: colesterolo	0,409	0,470	-	-
brassicasterolo	-	-	-0,789	0,611
24-metilencolesterolo	-	-	0,633	0,569
campesterolo	-	-	-	-
campestanolo	-	-	-	-
stigmasterolo	1,043	-0,455	0,635	0,262
Δ 7-campesterolo	-	-	-	-
Δ 5,23-stigmastadienolo	-	-	-	-
cleroasterolo	-	-	-	-
β -sitosterolo	-	-	1,008	0,389
sitostanolo	0,229	0,707	-	-
Δ 5-avenasterolo	-	-	-	-
Δ 5,24-stigmastadienolo	-0,560	-0,151	0,562	0,616
Δ 7-stigmasterolo	-	-	-	-
Δ 7-avenasterolo	-	-	-	-
eritrodiole+uvaolo	-0,334	0,593	0,673	-0,006
Polifenoli: idrossitirosole	-	-	0,652	-0,719
tirosolo	-	-	-	-
vanillico	-	-	-	-
totali	-0,447	0,213	0,592	0,605
Tocoferoli: α tocoferolo	0,570	-1,069	-	-
β tocoferolo	-	-	0,580	0,736
γ tocoferolo	0,542	1,105	-	-
Pigmenti: carotenoidi totali	-	-	-	-
clorofille totali	-	-	-	-
fitolo	-	-	-	-
Stabilità ossidativa	-	-	-	-
Aromi: <i>n</i> -ottano	-	-	-	-
etil acetato	-	-	-	-
2-metilbutanale	-1,454	2,230	-	-
3-metilbutanale	2,161	-2,397	0,615	0,078
etanolo	-	-	-1,115	0,558
pentan-3-one	-	-	-	-
1-penten-3-one	-	-	-	-
esanale	-	-	0,127	0,551
2-metil-1-propanolo	-	-	0,569	0,237
<i>trans</i> -2-pentenale	-	-	0,550	0,686
1-penten-3-olo	-1,229	-0,342	-0,043	-0,136
3-metil-1-butanolo	-	-	0,537	-0,558
<i>trans</i> -2-esenale	-	-	-	-
1-pentanolo	-	-	0,426	0,223
<i>cis</i> -2-penten-1-olo	-	-	-	-
1-esanolo	-	-	-	-
<i>cis</i> -3-esen-1-olo	0,738	0,928	-	-
<i>trans</i> -2-esenolo	-	-	-	-
acido acetico	-	-	-	-
1-ottanolo	-	-	-	-

- coefficienti delle funzioni discriminanti non significativi

4.4.9 – Stabilità ossidativa

La stabilità ossidativa è risultata correlata principalmente dal contenuto in polifenoli totali e dal rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi in Casaliva, dal contenuto in tocoferoli totali in Frantoio e Pendolino, e dal quantitativo in polifenoli totali in Leccino.

Correlando la stabilità ossidativa con il contenuto in polifenoli totali (tabella 53 e figura 28) si osserva che in Casaliva, Leccino, Pendolino e nell'insieme delle cultivar (totale 1) tale correlazione risulta significativa, ma ciò non accade nella cultivar Frantoio.

Considerando tutte le cultivar insieme (tabella 53 e figura 29) rientrano nel modello della regressione anche il rapporto tra gli acidi grassi saturi su quelli polinsaturi (totale 2).

Tabella 53 – Stabilità ossidativa (Ra): coefficienti e valori statistici della regressione multipla per le cultivar singole (Casaliva, Frantoio, Leccino e Pendolino) e nell'insieme (totale 1 e totale 2).

Modello	Intercetta e variabili indipendenti	Coefficienti	Errore std.	Sig.	R	R ²
Casaliva	(Costante)	75,368	13,125	0,000	0,420	0,176
	Polifenoli totali (Pf)	0,120	0,047	0,015		
Frantoio	(Costante)	88,808	22,801	0,060	0,024	0,001
	Polifenoli totali (Pf)	-0,004	0,117	0,976		
Leccino	(Costante)	63,170	13,577	0,000	0,714	0,510
	Polifenoli totali (Pf)	0,425	0,080	0,000		
Pendolino	(Costante)	60,322	31,115	0,089	0,473	0,224
	Polifenoli totali (Pf)	0,238	0,157	0,167		
Totale 1	(Costante)	49,357	19,331	0,013	0,338	0,114
	Polifenoli totali (Pf)	0,127	0,041	0,003		
Totale 2	(Costante)	-12,553	21,010	0,552	0,592	0,350
	Polifenoli totali (Pf)	0,183	0,037	0,000		
	Acidi grassi saturi / polinsaturi (S/P)	34,500	6,697	0,000		

Figura 28 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed il contenuto in polifenoli totali:

$$Ra=49,4+0,13*Pf \quad (r=0,592 \text{ e } r^2=0,350)$$

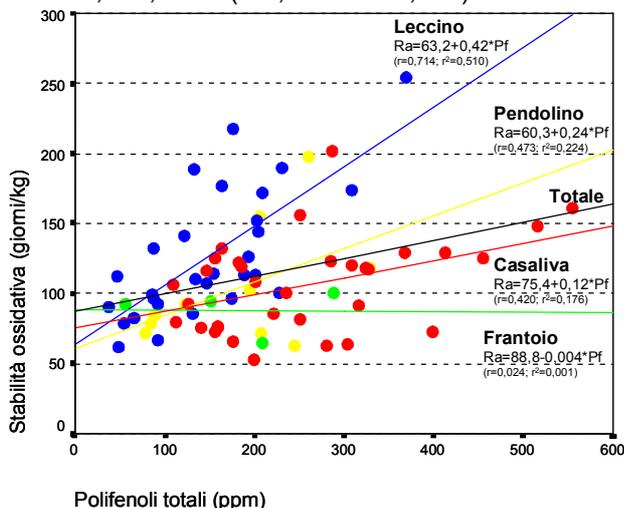
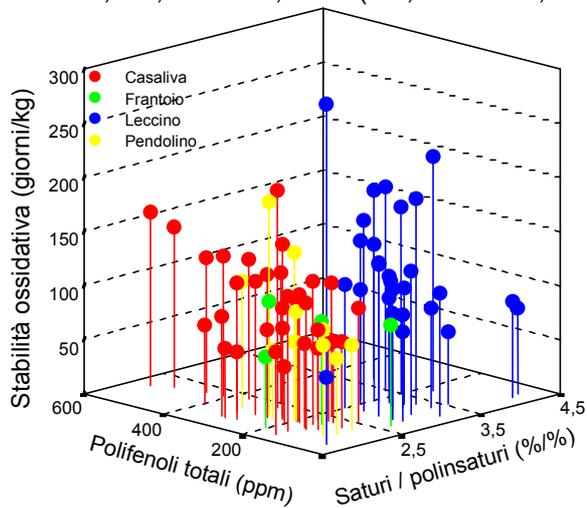


Figura 29 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed i polifenoli e gli acidi saturi su polinsaturi:

$$Ra=-12,6+0,18*Pf+34,5*S/P \quad (r=0,592 \text{ e } r^2=0,350)$$



4.4.10 – Analisi sensoriale

La cultivar Casaliva presenta valori alti nella nota di pomodoro e nel gradimento totale; Frantoio è caratterizzato dalle alte sensazioni in banana, burro e piccante, e da basse percezioni in carciofo, noce e dolce; Leccino possiede bassi valori in erba, amaro e piccante; ed infine Pendolino presenta una nota elevata in noce (tabella 54).

Il 1998 si caratterizza per il basso contenuto in erba, foglia, astringenza e nel gradimento; il 1999 ha un basso valore in banana, ed alti in astringenza e nel gradimento; il 2000 possiede alti contenuti in erba e mandorla, ed uno basso in fruttato; ed infine il 2001 ha alte sensazioni in foglia, fruttato e banana, ed una bassa in mandorla (tabella 54).

Si è osservato, inoltre, che le note di foglia, fiori, mandorla, mela, fieno ed astringente non sono risultate significative per differenziare le cultivar, e quelle di fiori, pomodoro, carciofo, mela, burro, noce, fieno, amaro dolce e piccante non lo sono state per gli anni.

Tabella 54 – Note sensoriali: punteggio normalizzato per le cultivar e gli anni (unità arbitraria).

VARIABILE	CULTIVAR				ANNI			
	Casaliva	Frantoio	Leccino	Pendolino	1998	1999	2000	2001
Erba	6,34b ¹	5,46b	4,04a	5,25ab	4,23a	5,69b	6,05b	5,32b
Foglia	5,85a	6,00a	4,76a	5,06a	5,01a	5,12a	5,61ab	6,58b
Fruttato	6,19b	6,67b	4,16a	3,89a	4,89ab	6,11bc	4,17a	6,68c
Fiori	5,50a	4,94a	5,13a	4,82a	5,43a	5,35a	4,96a	5,06a
Banana	5,24a	6,35b	4,97a	5,03a	5,03a	4,91a	5,34a	6,13b
Pomodoro	5,83b	4,52a	5,12ab	4,62a	5,44a	5,21a	5,23a	5,70a
Mandorla	5,04a	5,21a	5,61a	5,17a	4,98ab	5,37ab	5,72b	4,54a
Carciofo	5,23b	4,00a	5,41b	5,49b	5,02a	5,25a	5,52a	5,48a
Mela	5,23a	5,35a	5,02a	4,97a	4,93a	5,26a	5,21a	5,14a
Burro	4,91a	6,94b	5,36a	5,46a	5,22a	5,30a	5,43a	4,64a
Noce	5,67bc	4,47a	4,75ab	6,20c	5,46a	5,16a	5,39a	5,01a
Fieno	4,96a	4,99a	5,86a	5,05a	5,67a	5,41a	4,79a	5,51a
Amaro	5,91b	6,13b	4,02a	6,10b	4,63a	5,46a	5,59a	5,51a
Dolce	4,95ab	4,18a	5,76b	5,50b	5,33a	5,81a	4,91a	4,75a
Piccante	5,59ab	6,33b	4,48a	5,12ab	4,46a	5,64a	5,52a	4,91a
Astringente	5,15a	5,57a	5,07a	5,52a	4,84a	5,71b	5,15ab	5,00ab
Gradimento	13,63c	6,35a	6,43a	9,98b	7,23a	11,62b	11,43b	11,11b

¹ Le medie seguite dalla medesima lettera non sono diverse statisticamente per P=0,05

L'analisi discriminante è stata effettuata con il metodo normale a causa della variabilità dovuta alle aziende, alle condizioni ambientali e tecnologiche, ed al metodo soggettivo dell'analisi (tabelle 55 e 56, e figura 30).

Le cultivar non risultano essere separate da nessuna funzione significativa, mentre l'anno 2000 è parzialmente separato dagli altri dalle note di erba, fruttato e dolce, anche se la funzione non risulta essere molto significativa.

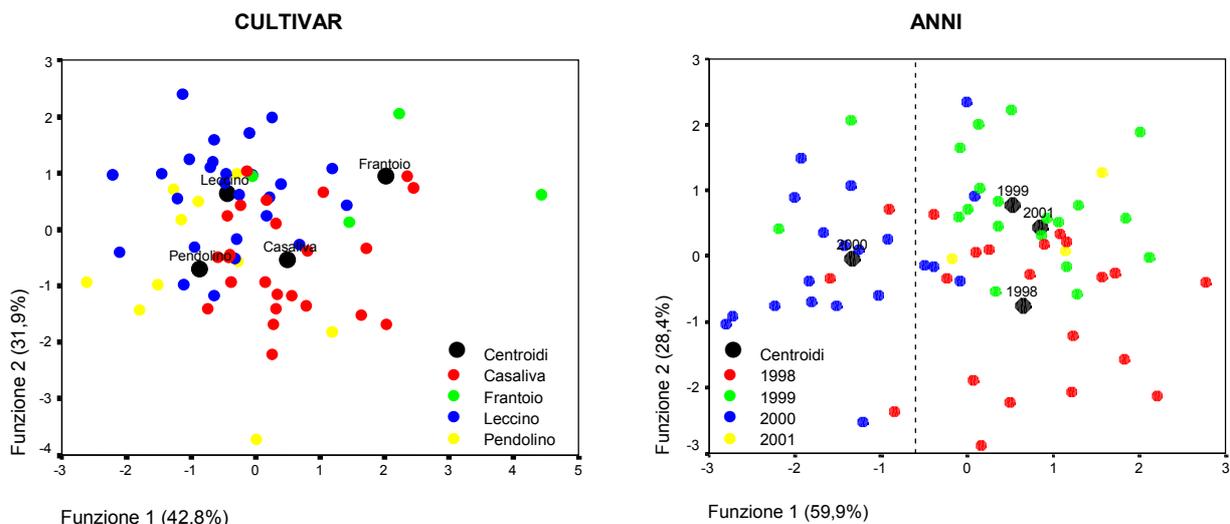
Tabella 55 – Note sensoriali: riepilogo delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
CULTIVAR	1	0,578	42,8	42,8	0,605	0,330	58,8	48	0,136
	2	0,431	31,9	74,6	0,549	0,520	34,6	30	0,257
	3	0,343	25,4	100,0	0,505	0,745	15,6	14	0,336
ANNI	1	0,866	59,9	59,9	0,681	0,325	59,5	48	0,123
	2	0,410	28,4	88,3	0,539	0,607	26,5	30	0,650
	3	0,169	11,7	100,0	0,380	0,856	8,3	14	0,875

Tabella 56 – Note sensoriali: coefficienti delle funzioni discriminanti per le cultivar e per gli anni.

VARIABILI	CULTIVAR			VARIABILI	ANNI		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Erba	-0,052	-0,781	0,073	Erba	-1,145	0,328	-0,344
Foglia	0,013	0,406	-0,173	Foglia	-0,245	0,001	0,651
Fruttato	0,866	0,411	-0,221	Fruttato	1,259	0,736	0,523
Fiori	-0,072	-0,084	-0,661	Fiori	0,119	-0,114	-0,280
Banana	0,681	0,246	0,390	Banana	-0,081	0,092	0,755
Pomodoro	0,054	0,070	-0,575	Pomodoro	0,321	-0,329	0,059
Mandorla	0,425	0,231	0,033	Mandorla	-0,173	0,630	-0,117
Carciofo	-0,234	0,112	-0,332	Carciofo	-0,372	0,059	0,406
Mela	0,325	0,061	0,007	Mela	0,091	0,136	0,230
Burro	0,221	0,273	0,555	Burro	0,139	0,076	0,063
Noce	-0,096	-0,464	0,301	Noce	0,307	-0,568	0,029
Fieno	-0,198	0,282	-0,152	Fieno	0,398	-0,239	0,015
Amaro	-0,518	-0,775	0,789	Amaro	0,018	0,280	-0,815
Dolce	-0,257	-0,026	0,236	Dolce	0,545	0,426	-0,455
Piccante	0,400	0,318	-0,454	Piccante	-0,147	-0,263	0,021
Astringente	0,000	0,310	0,337	Astringente	0,161	0,470	-0,058

Figura 30 – Note sensoriali: punteggi delle prime funzioni canoniche per le cultivar e per gli anni.

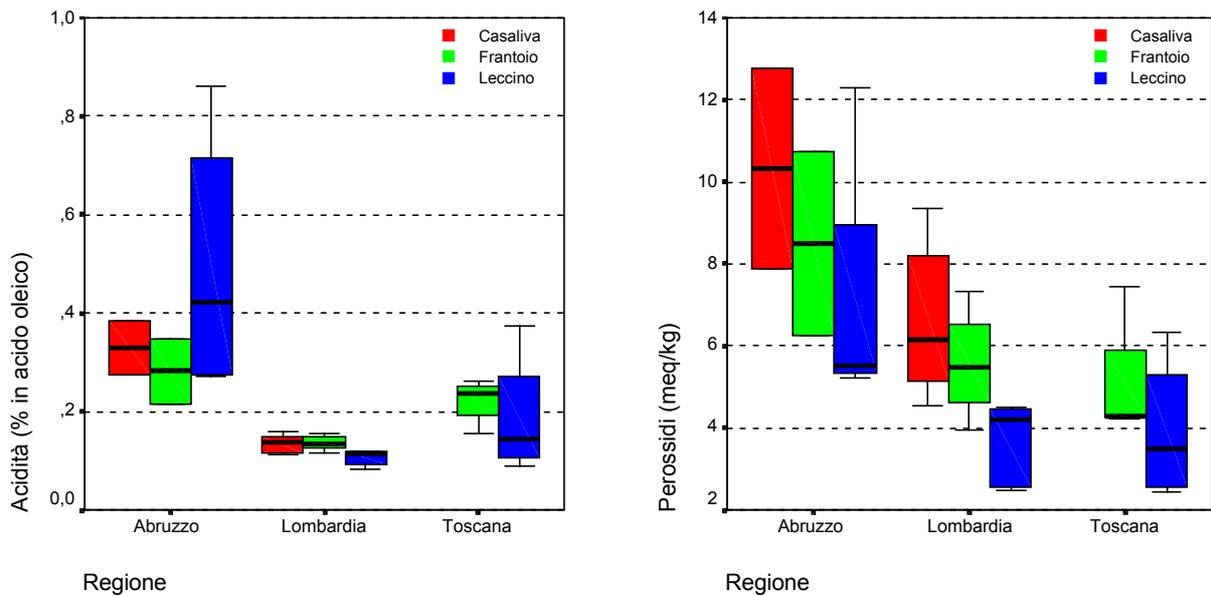


4.5 – AMBIENTE E QUALITÀ: INFLUENZE REGIONALI IN ITALIA

I valori di acidità, del numero di perossidi e gli indici spettrofotometrici degli oli ottenuti dalle cultivar Casaliva, Frantoio e Leccino, raccolte in 3 stadi di maturazione (verde, invaiato e maturo) in 3 siti olivicoli italiani (Abruzzo, Lombardia e Toscana) nei 2 anni di osservazione (2000 e 2001) mostrano che si tratta di oli di buona qualità appartenenti alla categoria degli extra vergini (tabella 57).

I valori dell'acidità e del numero di perossidi (figura 31) sono sempre contenuti sotto i livelli massimi previsti dai regolamenti CE al fine della classificazione in oli extra vergini ($\leq 0,8\%$ per l'acidità e ≤ 20 meq O_2/kg per i perossidi). I campioni abruzzesi mostrano intervalli medi di acidità e perossidi (circa 0,35% e 8,2meq/kg) più alti rispetto agli altri siti (circa 0,15% e 5,3meq/kg per la Lombardia, e 0,2% e 3,9meq/kg per la Toscana).

Figura 31 – Acidità e numero di perossidi: intervalli per cultivar nei 2 anni.



Gli indici spettrofotometrici nell'U.V. sono risultati sempre sotto i livelli soglia previsti dal regolamento CE, 2,50 per il K_{232} , 0,22 per il K_{270} e 0,01 per il ΔK , mentre gli indici nel visibile presentano i massimi di assorbimento nella fase di maturazione "verde", ad eccezione della Casaliva lombarda, dovuti alle colorazioni più intense degli oli per la presenza di contenuti maggiori in pigmenti.

Tabella 57–Acidità, perossidi e spettrofotometria: valori delle cultivar, nelle regioni, negli stadi di maturazioni.

VARIABILE (unità di misura)		CASALIVA				
Regione		Abruzzo		Lombardia		
Stadio di maturazione		verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo
Acidità (% ac. oleico)		0,27	0,39	0,13	0,13	0,15
Perossidi (meq O ₂ /kg)		7,87	12,78	6,74	5,76	7,24
Spettrofotometria U.V.:	K ₂₃₂	1,59	1,52	1,37	1,27	1,18
	K ₂₇₀	0,16	0,14	0,10	0,09	0,06
	ΔK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spettrofotometria VIS:	K ₄₁₄	0,20	0,16	0,14	0,20	0,13
	K ₄₄₈	0,16	0,14	0,13	0,17	0,15
	K ₄₇₅	0,13	0,11	0,11	0,15	0,12
	K ₆₇₀	0,07	0,04	0,04	0,07	0,04

VARIABILE (unità di misura)		FRANTOIO							
Regione		Abruzzo		Lombardia			Toscana		
Stadio di maturazione		verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo	verde	invaiaato	matturo
Acidità (% ac. oleico)		0,22	0,35	0,12	0,14	0,15	0,15	0,24	0,26
Perossidi (meq O ₂ /kg)		6,27	10,75	6,02	5,65	4,63	4,27	5,88	4,24
Spettrofotometria U.V.:	K ₂₃₂	1,39	1,52	1,31	1,30	1,07	1,27	1,44	1,41
	K ₂₇₀	0,11	0,15	0,10	0,09	0,05	0,10	0,13	0,11
	ΔK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spettrofotometria VIS:	K ₄₁₄	0,19	0,14	0,22	0,21	0,21	0,17	0,10	0,08
	K ₄₄₈	0,15	0,12	0,19	0,18	0,24	0,13	0,09	0,06
	K ₄₇₅	0,12	0,10	0,16	0,15	0,21	0,10	0,07	0,06
	K ₆₇₀	0,07	0,06	0,08	0,06	0,07	0,06	0,03	0,02

VARIABILE (unità di misura)		LECCINO							
Regione		Abruzzo		Lombardia			Toscana		
Stadio di maturazione		verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo	verde	invaiaato	matturo
Acidità (% ac. oleico)		0,27	0,71	0,10	0,10	0,16	0,12	0,23	0,17
Perossidi (meq O ₂ /kg)		5,35	8,94	4,48	3,40	3,30	4,26	4,51	2,43
Spettrofotometria U.V.:	K ₂₃₂	1,37	1,33	1,28	1,24	1,17	1,45	1,40	1,41
	K ₂₇₀	0,10	0,10	0,09	0,08	0,07	0,13	0,12	0,11
	ΔK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spettrofotometria VIS:	K ₄₁₄	0,16	0,13	0,28	0,12	0,11	0,16	0,11	0,07
	K ₄₄₈	0,14	0,13	0,25	0,13	0,13	0,13	0,10	0,06
	K ₄₇₅	0,12	0,11	0,21	0,13	0,11	0,11	0,09	0,06
	K ₆₇₀	0,05	0,04	0,11	0,04	0,04	0,05	0,03	0,02

4.5.1 – Acidi grassi

Tabella 58 – Acidi grassi: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (%).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo
M – miristico C _{14:0}			0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
P – palmitico C _{16:0}			14,43	13,40	11,95	11,48	11,10
P _o – palmitoleico C _{16:1}			0,91	0,85	0,74	0,72	0,72
E _a – eptadecanoico C _{17:0}			0,04	0,05	0,05	0,04	0,05
E _e – eptadecenoico C _{17:1}			0,08	0,08	0,09	0,09	0,10
S – stearico C _{18:0}			1,93	1,96	1,64	1,58	1,58
O – oleico C _{18:1}			74,68	75,53	77,92	79,16	79,02
L – linoleico C _{18:2}			6,36	6,43	5,99	5,31	5,79
L _n – linolenico C _{18:3}			0,75	0,82	0,74	0,72	0,72
A – arachico C _{20:0}			0,35	0,38	0,34	0,34	0,34
E _c – eicosenoico C _{20:1}			0,30	0,33	0,38	0,39	0,39
B – behenico C _{22:0}			0,11	0,11	0,12	0,11	0,12
L _g – lignocerico C _{24:0}			0,06	0,06	0,05	0,04	0,05

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo	verde	invaiaio	matturo
M – miristico C _{14:0}			0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
P – palmitico C _{16:0}			13,51	13,32	12,13	11,78	10,84	13,87	13,76	12,37
P _o – palmitoleico C _{16:1}			0,79	0,87	0,75	0,81	0,66	1,11	1,22	1,02
E _a – eptadecanoico C _{17:0}			0,05	0,10	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04
E _e – eptadecenoico C _{17:1}			0,08	0,08	0,09	0,10	0,10	0,08	0,08	0,09
S – stearico C _{18:0}			1,97	1,90	1,69	1,67	1,64	2,20	2,17	2,10
O – oleico C _{18:1}			76,75	76,68	77,70	77,83	79,86	73,61	73,53	75,24
L – linoleico C _{18:2}			5,13	5,44	5,98	6,24	5,26	7,69	7,95	7,77
L _n – linolenico C _{18:3}			0,78	0,76	0,73	0,69	0,72	0,58	0,54	0,55
A – arachico C _{20:0}			0,38	0,35	0,34	0,33	0,34	0,36	0,33	0,36
E _c – eicosenoico C _{20:1}			0,34	0,32	0,37	0,35	0,36	0,29	0,24	0,30
B – behenico C _{22:0}			0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,10	0,09	0,11
L _g – lignocerico C _{24:0}			0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04

VARIABILE	LECCINO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo	verde	invaiaio	matturo
M – miristico C _{14:0}			0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
P – palmitico C _{16:0}			15,23	13,48	14,06	13,79	13,37	14,93	14,52	14,46
P _o – palmitoleico C _{16:1}			1,33	1,35	1,04	1,19	1,21	1,58	1,57	2,15
E _a – eptadecanoico C _{17:0}			0,04	0,03	0,05	0,04	0,05	0,04	0,03	0,04
E _e – eptadecenoico C _{17:1}			0,06	0,06	0,09	0,10	0,11	0,06	0,07	0,09
S – stearico C _{18:0}			2,18	1,98	1,71	1,59	1,56	2,28	2,03	1,95
O – oleico C _{18:1}			73,42	75,69	76,60	77,72	78,06	72,81	72,00	74,70
L – linoleico C _{18:2}			6,35	6,34	4,93	4,21	4,29	6,99	8,53	5,44
L _n – linolenico C _{18:3}			0,73	0,46	0,78	0,69	0,67	0,66	0,59	0,55
A – arachico C _{20:0}			0,32	0,28	0,30	0,27	0,27	0,31	0,31	0,29
E _c – eicosenoico C _{20:1}			0,23	0,21	0,29	0,29	0,28	0,24	0,24	0,24
B – behenico C _{22:0}			0,08	0,08	0,10	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
L _g – lignocerico C _{24:0}			0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02

La cultivar Casaliva in Abruzzo si caratterizza per elevati contenuti in palmitico, palmitoleico, stearico, linoleico, linolenico ed arachico, e per bassi valori in oleico ed eicosenoico; in Lombardia si distingue per bassi contenuti in palmitico e linoleico, ed uno elevato in oleico (tabella 58).

La cultivar Frantoio in Abruzzo si caratterizza per un basso valore in linoleico ed alti in linolenico e arachico, allo stadio verde; in Lombardia si distingue per i contenuti bassi in palmitico, palmitoleico e stearico, ed alti in oleico ed eicosenoico, alla maturazione; in Toscana si evidenzia per alti contenuti in palmitico, palmitoleico, stearico e linoleico, e bassi in oleico, linolenico ed eicosenoico, allo stadio invaiato.

La cultivar Leccino in Abruzzo si evidenzia per gli elevati contenuti in palmitico ed arachico, nella fase verde, e per bassi contenuti in linolenico ed eicosenoico, nella fase invaiata; in Lombardia si caratterizza per bassi valori in palmitico, palmitoleico, stearico e linoleico, ed alti in oleico e linolenico; in Toscana si distingue per alti valori in palmitoleico, stearico e linoleico, ed uno basso in oleico, all'invaiatura.

Lo stadio di maturazione “verde” è distinto in base agli acidi palmitoleico ed eptadecanoico (funzione 1), oltre che al palmitico (funzione 2); nel loro insieme sono in grado di separare Casaliva e Frantoio della Lombardia e della Toscana da Leccino toscano e da Casaliva, Frantoio e Leccino abruzzesi e Leccino lombardo (tabelle 59 e 60, e figura 32).

Lo stadio di “invaiatura” è distinto in base agli acidi eptadecanoico, eptadecenoico e stearico (funzione 1), oltre che al palmitico e stearico (funzione 2), che riescono a separare le tre cultivar della Lombardia da Casaliva e Frantoio abruzzesi e da Leccino abruzzese con le varietà toscane.

Lo stadio “maturo” è distinto solo in base agli acidi miristico e palmitico (funzione 1), e separa Casaliva e Frantoio della Lombardia dal Frantoio toscano e da Leccino nelle due regioni.

Considerando tutti i campioni di olio globalmente, Leccino lombardo si distingue da Casaliva e Frantoio della Lombardia, e le tre cultivar abruzzesi sono separate da quelle toscane, in base agli acidi oleico e linoleico (funzione 1), oltre che all'oleico, linoleico ed eicosenoico (funzione 2).

Tabella 59 – Acidi grassi: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

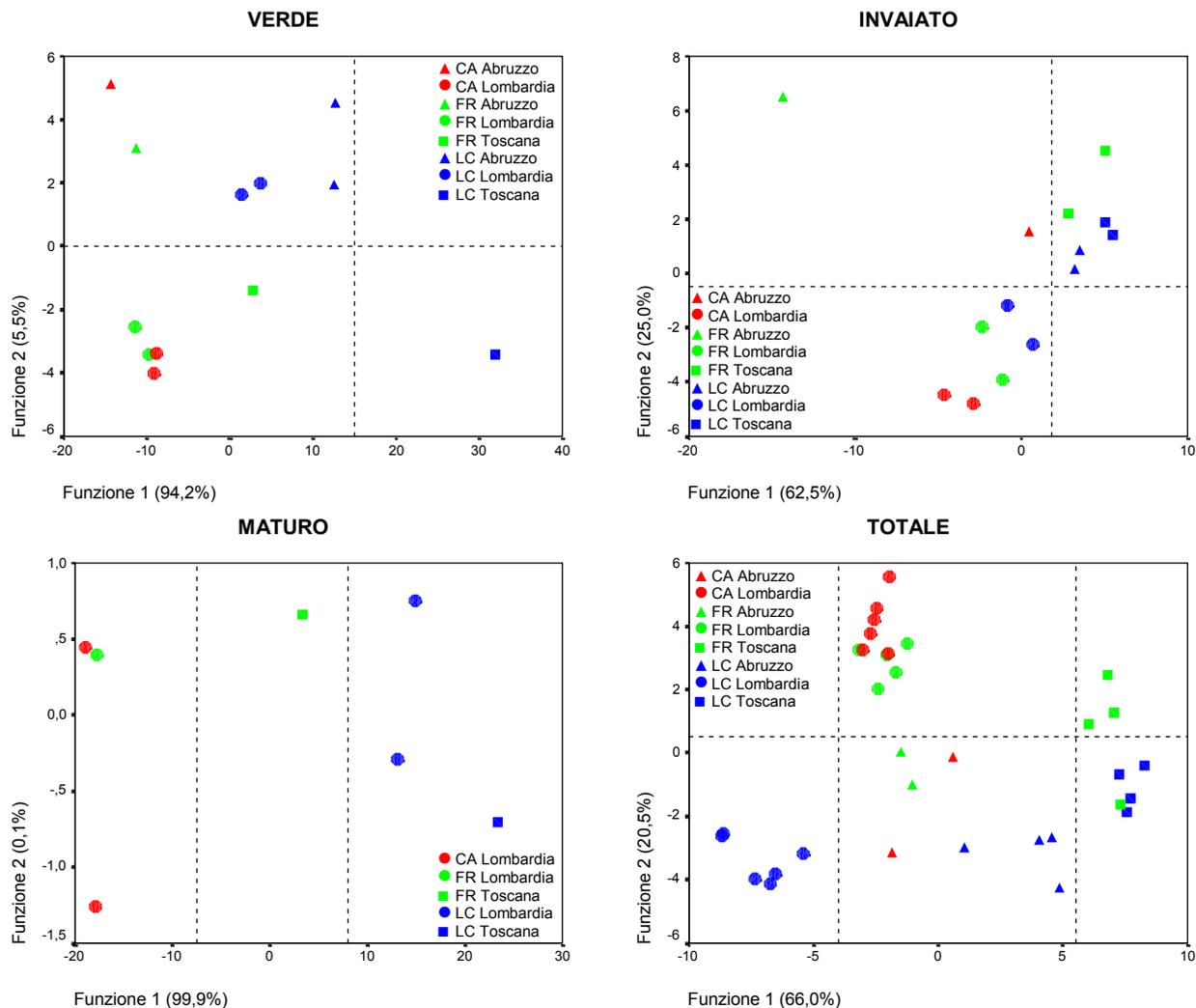
Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	519,5	94,2	94,2	0,999	0,000	54,1	28	0,002
	2	30,30	5,5	99,7	0,984	0,010	22,8	18	0,199
	3	1,206	0,2	99,9	0,739	0,328	5,6	10	0,850
INVAIATO	1	58,35	62,5	62,5	0,992	0,000	66,7	42	0,009
	2	23,35	25,0	87,5	0,979	0,001	42,2	30	0,069
	3	9,533	10,2	97,7	0,951	0,022	23,0	20	0,289
MATURO	1	969,7	99,9	99,9	0,999	0,001	18,6	8	0,017
	2	0,764	0,1	100,0	0,658	0,567	1,4	3	0,701
TOTALE	1	34,02	66,0	66,0	0,986	0,000	215,1	77	0,000
	2	10,57	20,5	86,5	0,956	0,002	135,1	60	0,000
	3	4,383	8,5	95,0	0,902	0,029	80,0	45	0,001

Tabella 60 – Acidi grassi: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Miristico	-2,176	-0,875	1,201	Palmitico	0,828	0,818	1,031
Palmitico	-3,512	2,893	0,005	Eptadecanoico	-1,284	0,532	-0,086
Palmitoleico	10,697	-1,549	-0,406	Eptadecenoico	1,155	-0,274	1,485
Eptadecanoico	7,876	1,074	-0,608	Stearico	1,041	0,942	0,641

VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Miristico	4,123	0,834	-	Palmitico	4,127	-0,181	5,489
Palmitico	4,204	-0,170	-	Palmitoleico	3,594	0,824	0,548
				Stearico	2,032	1,523	-0,157
				Oleico	11,544	2,153	10,768
				Linoleico	10,419	2,474	8,290
				Arachico	0,863	-1,231	2,249
				Eicosenoico	0,760	2,344	-1,967

Figura 32 – Acidi grassi: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.2 – Trigliceridi

Tabella 61 – Trigliceridi: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (%).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo
LLL			0,05	0,05	0,05	0,04	0,04
OLL _n +P _o P _o L			0,19	0,19	0,16	0,15	0,19
PLL _n			0,07	0,06	0,05	0,04	0,06
OLL			1,05	1,01	0,97	0,78	0,86
OOL _n +P _o OL+PLL			1,62	1,70	1,57	1,56	1,60
POL _n			0,68	0,69	0,66	0,63	0,59
E _o OL			0,06	0,06	0,08	0,06	0,05
OOL+P _o OO			11,06	11,13	10,81	10,12	11,21
POL+P _o PO			5,76	5,61	4,93	4,37	4,60
PPL			0,58	0,44	0,38	0,30	0,32
E _o OO			0,15	0,20	0,15	0,17	0,18
E _o OP			0,08	0,07	0,06	0,07	0,05
OOO			40,96	42,15	45,18	49,27	48,94
POO+SOL			27,22	26,53	25,81	24,10	23,15
PPO+PSL			4,15	3,80	3,49	2,88	2,64
E _o OO			0,13	0,12	0,09	0,08	0,07
E _c OO			0,55	0,56	0,75	0,79	0,79
SOO			3,77	3,76	3,36	3,31	3,26
PSO			1,09	0,92	0,75	0,58	0,61
AOO			0,56	0,72	0,58	0,61	0,69
SSO			0,23	0,24	0,14	0,10	0,10

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo	verde	invaiaato	matturo
LLL			0,05	0,04	0,06	0,03	0,04	0,08	0,07	0,08
OLL _n +P _o P _o L			0,16	0,16	0,19	0,17	0,17	0,17	0,19	0,18
PLL _n			0,05	0,04	0,05	0,05	0,03	0,05	0,05	0,02
OLL			0,73	0,77	0,97	0,98	0,78	1,64	1,65	1,53
OOL _n +P _o OL+PLL			1,54	1,55	1,64	1,58	1,58	1,67	1,55	1,53
POL _n			0,69	0,68	0,63	0,60	0,59	0,68	0,53	0,50
E _o OL			0,04	0,10	0,06	0,07	0,04	0,03	0,06	0,04
OOL+P _o OO			9,21	9,55	11,28	11,73	10,42	12,70	13,58	13,49
POL+P _o PO			4,76	4,97	4,95	5,05	4,05	6,98	6,98	6,25
PPL			0,46	0,39	0,42	0,35	0,28	0,74	0,69	0,42
E _o OO			0,20	0,18	0,22	0,20	0,22	0,17	0,17	0,11
E _o OP			0,13	0,06	0,08	0,12	0,08	0,09	0,11	0,11
OOO			44,41	43,80	46,93	47,33	51,42	38,12	39,26	42,79
POO+SOL			27,24	27,64	23,90	23,42	22,28	26,21	25,32	23,85
PPO+PSL			3,95	3,88	2,98	2,80	2,37	4,13	3,74	3,11
E _o OO			0,13	0,10	0,09	0,07	0,07	0,08	0,09	0,08
E _c OO			0,71	0,59	0,75	0,67	0,82	0,46	0,43	0,51
SOO			3,88	3,86	3,41	3,38	3,57	4,02	3,96	3,80
PSO			0,94	0,89	0,68	0,68	0,58	1,17	0,97	0,84
AOO			0,57	0,60	0,56	0,55	0,49	0,62	0,42	0,63
SSO			0,15	0,13	0,15	0,16	0,11	0,17	0,17	0,13

VARIABILE Regione Stadio di maturazione	LECCINO							
	Abruzzo		Lombardia			Toscana		
	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo	verde	invaiaio	matturo
LLL	0,05	0,07	0,06	0,03	0,03	0,09	0,12	0,03
OLL _n +P _o P _o L	0,20	0,25	0,16	0,12	0,14	0,23	0,22	0,18
PLL _n	0,08	0,09	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,04
OLL	0,96	1,36	0,70	0,50	0,50	1,24	2,03	0,67
OOL _n +P _o OL+PLL	1,66	1,77	1,61	1,56	1,52	1,74	1,88	1,71
POL _n	0,76	0,72	0,74	0,71	0,65	0,70	0,57	0,64
E _o OL	0,06	0,11	0,08	0,07	0,04	0,07	0,06	0,05
OOL+P _o OO	11,06	12,32	9,05	8,55	9,02	12,22	13,40	11,84
POL+P _o PO	6,66	7,18	5,02	4,52	4,52	6,84	7,85	6,08
PPL	0,79	0,69	0,46	0,39	0,38	0,58	0,83	0,35
E _o OO	0,12	0,08	0,13	0,19	0,18	0,05	0,10	0,05
E _o OP	0,08	0,05	0,05	0,10	0,07	0,09	0,06	0,04
OOO	38,09	37,51	45,24	47,45	48,25	37,46	36,71	41,59
POO+SOL	28,17	26,98	27,36	26,90	26,26	27,52	26,33	27,23
PPO+PSL	4,89	4,55	3,92	3,63	3,54	4,63	4,23	4,14
E _o OO	0,07	0,06	0,09	0,10	0,09	0,08	0,06	0,03
E _o OO	0,41	0,40	0,58	0,56	0,33	0,37	0,42	0,38
SOO	3,88	3,85	3,33	3,22	3,13	4,01	3,38	3,43
PSO	1,22	1,25	0,74	0,78	0,73	1,30	1,03	0,97
AOO	0,56	0,48	0,48	0,46	0,44	0,41	0,50	0,42
SSO	0,23	0,22	0,12	0,13	0,10	0,30	0,15	0,12

In Abruzzo, Casaliva si distingue per valori alti in OLL, OOL_n+P_oOL+PLL, POL+P_oPO, POO+SOL, PPO+PSL, SOO e PSO, ed uno basso in OOO; Frantoio si caratterizza per bassi contenuti in OLL, OOL+P_oOO e POL+P_oPO, ed uno alto in POO+SOL; Leccino si differenzia per alti quantitativi in POO+SOL, PPO+PSL e PSO (tabella 61).

In Lombardia, Casaliva si caratterizza per bassi contenuti in OLL, OOL_n+P_oOL+PLL, POL+P_oPO, POO+SOL, PPO+PSL, SOO e PSO, ed uno alto in OOO; Frantoio si distingue per un alto contenuto in OOO, e bassi in POO+SOL, PPO+PSL, SOO e PSO; Leccino si evidenzia per bassi quantitativi in OOL_n+P_oOL+PLL, OOL+P_oOO, POO+SOL, PPO+PSL, SOO e PSO, ed uno alto in OOO.

In Toscana, Frantoio si differenzia per alti contenuti in OLL, OOL+P_oOO, PPO+PSL, SOO e PSO, ed uno basso in OOO; Leccino si evidenzia per alti valori in OLL, OOL_n+P_oOL+PLL, OOL+P_oOO, POL+P_oPO e SOO, ed uno basso in OOO.

L'epoca "verde" è caratterizzata principalmente dai trigliceridi LLL, OLL_n+P_oP_oL e OLL (funzione 1), e parzialmente dal PLL_n (funzione 2), che separano le cultivar lombarde e Frantoio abruzzese, da Leccino e Casaliva abruzzese, da Frantoio e da Leccino toscano (tabelle 62 e 63, e figura 33).

L'epoca "invaiaio" è caratterizzata dai trigliceridi LLL e OLL (funzione 1), oltre che da OLL e OOL_n+P_oOL+PLL (funzione 2), che separano le cultivar lombarde, da Frantoio toscano, da Leccino abruzzese, e da Casaliva e Frantoio dell'Abruzzo e Leccino della Toscana.

L'epoca "matura" è determinata dai trigliceridi LLL e OLL_n+P_oP_oL (funzioni 1 e 2), che separano Leccino della Lombardia da quello toscano e da Casaliva e Frantoio della Lombardia da Frantoio della Toscana.

In complesso, i campioni di olio sono ben in base ai trigliceridi POL+P_oPO, e OOO (funzioni 1 e 2), che distinguono Casaliva e Frantoio della Lombardia con Casaliva dell'Abruzzo da Frantoio abruzzese e toscano, e da Leccino della Lombardia da quello dell'Abruzzo e da quello della Toscana.

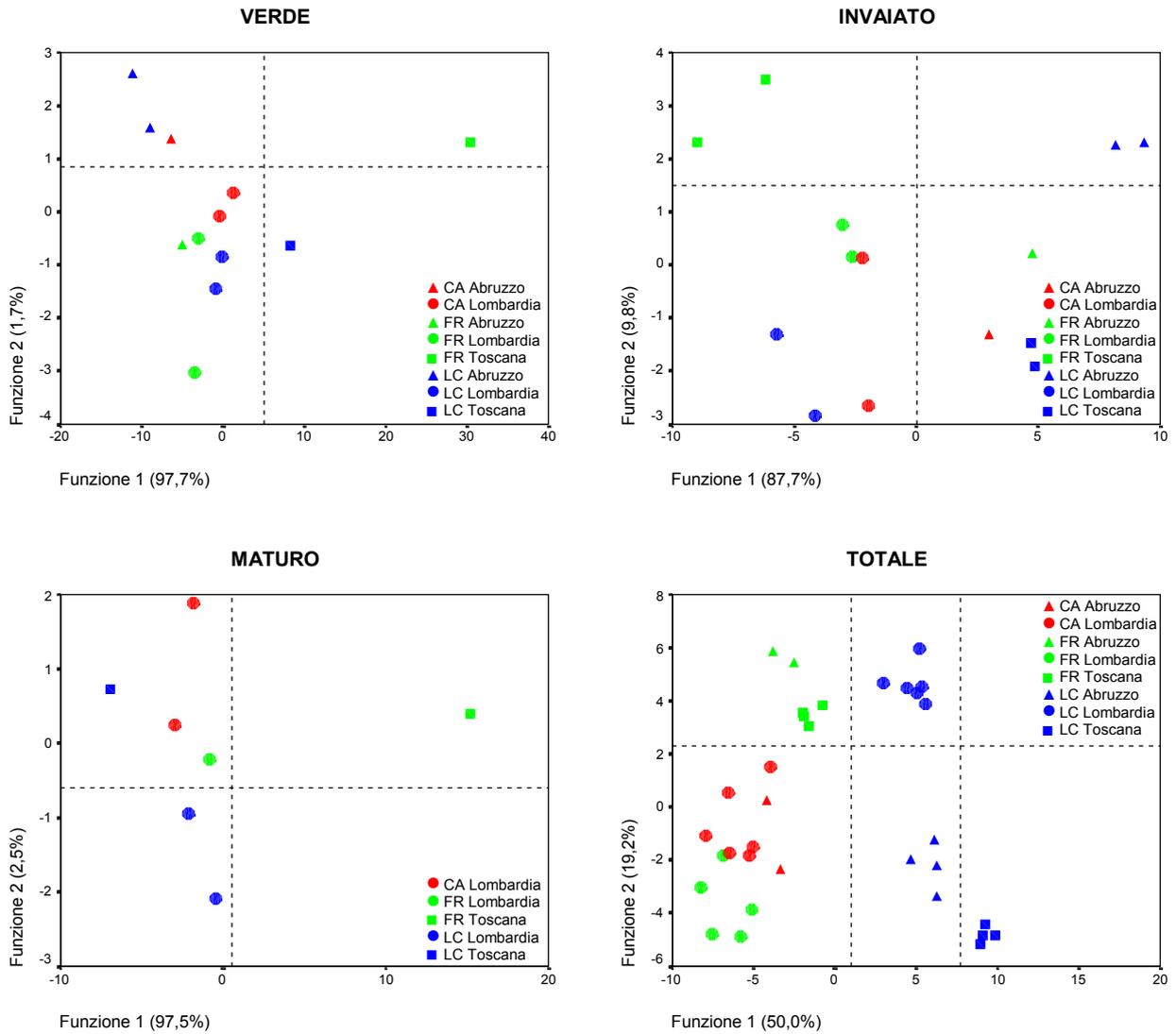
Tabella 62 – Trigliceridi: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	320,0	97,7	97,7	0,998	0,000	45,0	28	0,022
	2	5,465	1,7	99,3	0,919	0,039	16,2	18	0,580
	3	1,785	0,5	99,9	0,801	0,254	6,8	10	0,740
INVAIATO	1	69,87	87,7	87,7	0,993	0,000	47,6	42	0,255
	2	7,781	9,8	97,4	0,941	0,025	22,1	30	0,852
	3	1,186	1,5	98,9	0,737	0,222	9,0	20	0,983
MATURO	1	147,2	97,5	97,5	0,997	0,001	16,4	8	0,037
	2	3,802	2,5	100,0	0,890	0,208	3,9	3	0,270
TOTALE	1	44,36	50,0	50,0	0,989	0,000	266,9	133	0,000
	2	17,00	19,2	69,1	0,972	0,000	196,3	108	0,000
	3	13,37	15,1	84,2	0,965	0,000	142,8	85	0,000

Tabella 63 – Trigliceridi: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
LLL	6,731	-0,858	0,205	LLL	11,158	-0,666	1,654
OLL _n +P _o P _o L	-8,904	-1,142	1,038	OLL _n +P _o P _o L	8,614	1,211	0,972
PLL _n	1,598	2,078	-0,217	PLL _n	-5,506	0,882	-1,449
OLL	7,132	1,127	-0,101	OLL	-18,308	2,374	-0,663
				OOL _n +P _o OL+PLL	4,921	-3,302	-0,248
VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
LLL	2,913	-0,044	-	LLL	4,108	2,609	-1,117
OLL _n +P _o P _o L	-2,720	1,041	-	OLL _n +P _o P _o L	-2,388	-0,150	0,520
				OLL	-5,919	-2,034	4,474
				OOL _n +P _o OL+PLL	0,650	-4,908	1,247
				POL _n	-1,551	1,390	0,756
				OOL+P _o OO	-2,731	-4,645	5,471
				POL+P _o PO	18,440	11,830	2,163
				PPL	-3,667	-2,601	2,247
				OOO	12,346	1,007	15,150
				PPO+PSL	4,464	-3,560	1,649

Figura 33 – Trigliceridi: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.3 – Alcoli alifatici

Tabella 64 – Alcoli alifatici: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (ppm).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo
Docosanolu C ₂₂ -OH			10,16	17,48	5,95	5,63	8,74
Tricosanolu C ₂₃ -OH			1,23	2,02	0,89	0,69	0,96
Tetracosanolu C ₂₄ -OH			19,69	31,31	14,69	10,01	14,49
Pentacosanolu C ₂₅ -OH			3,18	3,98	3,26	1,77	2,61
Esacosanolu C ₂₆ -OH			40,04	47,11	41,18	19,76	32,75
Eptacosanolu C ₂₇ -OH			2,13	2,67	2,76	1,21	2,60
Ottacosanolu C ₂₈ -OH			13,97	16,18	15,55	6,37	13,08
Alcoli alifatici totali			90,40	120,75	84,28	45,44	75,23

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo	verde	invaioato	matturo
Docosanolu C ₂₂ -OH			5,76	15,13	5,85	9,86	10,67	19,05	28,56	25,94
Tricosanolu C ₂₃ -OH			0,78	1,59	0,83	1,05	0,90	1,67	2,10	2,18
Tetracosanolu C ₂₄ -OH			11,69	25,86	14,36	18,18	13,84	33,97	40,98	41,51
Pentacosanolu C ₂₅ -OH			2,66	3,56	2,82	2,70	2,62	3,00	2,43	2,91
Esacosanolu C ₂₆ -OH			36,12	43,16	33,68	32,30	33,48	43,91	30,94	39,53
Eptacosanolu C ₂₇ -OH			2,31	2,38	2,18	2,13	2,71	2,11	1,53	1,88
Ottacosanolu C ₂₈ -OH			15,24	15,94	11,63	11,03	14,40	14,21	9,47	14,12
Alcoli alifatici totali			74,55	107,61	71,36	77,26	78,62	117,94	116,01	128,06

VARIABILE	LECCINO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo	verde	invaioato	matturo
Docosanolu C ₂₂ -OH			20,46	33,29	8,39	10,28	9,44	25,60	38,53	24,55
Tricosanolu C ₂₃ -OH			2,20	3,84	1,33	1,46	1,40	2,47	3,34	2,66
Tetracosanolu C ₂₄ -OH			36,99	58,12	22,00	23,30	18,26	52,98	54,26	53,68
Pentacosanolu C ₂₅ -OH			2,27	2,80	2,77	2,70	2,01	2,69	3,03	2,80
Esacosanolu C ₂₆ -OH			29,66	36,34	41,81	35,56	28,59	39,64	39,86	38,62
Eptacosanolu C ₂₇ -OH			1,65	2,11	2,82	2,27	2,09	1,59	1,90	1,71
Ottacosanolu C ₂₈ -OH			13,08	17,44	20,08	17,40	14,50	13,25	14,85	15,76
Alcoli alifatici totali			106,32	153,94	99,21	92,97	76,29	138,23	155,77	139,79

La cultivar Casaliva è caratterizzata da valori alti in Abruzzo e da valori bassi in Lombardia, allo stadio invaiato (tabella 64).

La cultivar Frantoio si distingue in Abruzzo per valori alti in docosanolu, tricosanolu e tetracosanolu, ed uno alto in ottacosanolu, in Lombardia per valori bassi in pentacosanolu ed alcoli totali, ed uno alto in eptacosanolu, ed in Toscana per valori alti in docosanolu, tricosanolu, tetracosanolu, pentacosanolu ed alcoli totali, e bassi in eptacosanolu ed ottacosanolu.

La cultivar Leccino si differenzia in Abruzzo per alti valori in tricosanolu e tetracosanolu, ed uno basso in ottacosanolu, in Lombardia per bassi valori in docosanolu, tricosanolu, tetracosanolu, pentacosanolu ed alcoli totali, ed alti in eptacosanolu ed ottacosanolu, ed in Toscana per alti valori in docosanolu, pentacosanolu ed alcoli totali, ed uno basso in eptacosanolu.

Lo stadio di maturazione “verde” è caratterizzato dagli alcoli tricosanolo e tetracosanolo (funzione 1), oltre che da docosanolo e tetracosanolo (funzione 2), e sono in grado di separare le cultivar Casaliva e Frantoio delle tre regioni, da Leccino abruzzese, lombardo e toscano (tabelle 65 e 66, e figura 34).

Lo stadio di maturazione “invaio” è caratterizzato dal docosanolo e pentacosanolo (funzione 1), oltre che dal docosanolo e tricosanolo (funzione 2), ed insieme separano le cultivar della Toscana, da quelle della Lombardia, separando anche Casaliva e Frantoio da Leccino dell’Abruzzo.

Lo stadio di maturazione “maturo” è caratterizzato dal docosanolo e tricosanolo (funzioni 1 e 2), in grado di separare le cultivar lombarde da Leccino e da Frantoio della Toscana.

Nell’insieme, la separazione dei campioni è definita dall’esacosanolo ed eptacosanolo (funzione 1), oltre che dal tricosanolo ed esacosanolo (funzione 2). E’ così possibile separare le cultivar Casaliva e Frantoio della Lombardia e dell’Abruzzo dai rispettivi Leccini, e da Frantoio e Leccino della Toscana.

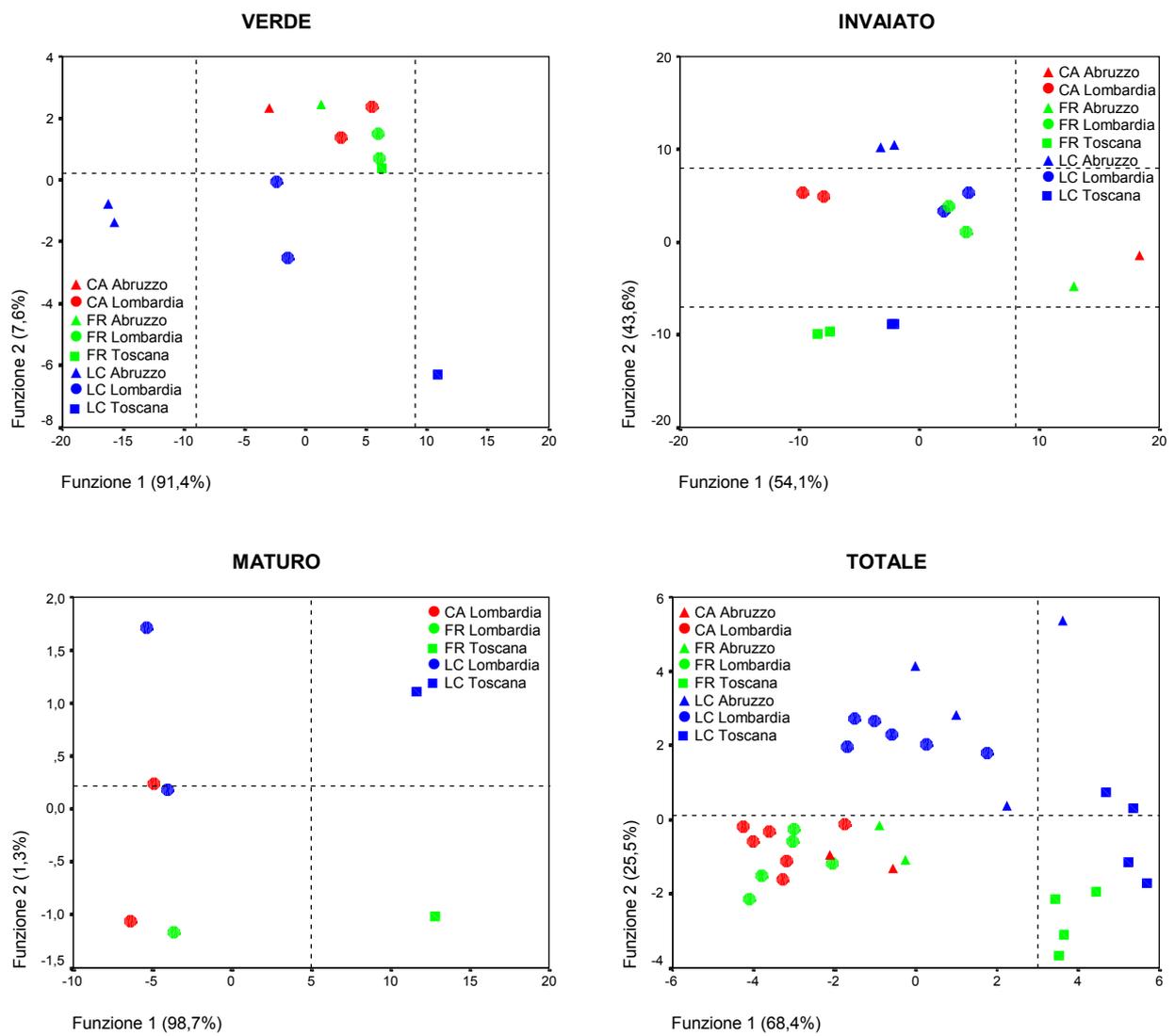
Tabella 65 – Alcoli alifatici: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	198,2	91,4	91,4	0,997	0,000	46,9	28	0,014
	2	16,50	7,6	99,0	0,971	0,017	20,4	18	0,311
	3	2,114	1,0	100,0	0,824	0,297	6,1	10	0,809
INVAIATO	1	141,9	54,1	54,1	0,996	0,000	72,6	42	0,002
	2	114,3	43,6	97,6	0,996	0,001	42,9	30	0,060
	3	5,627	2,1	99,8	0,921	0,091	14,4	20	0,810
MATURO	1	211,7	98,7	98,7	0,998	0,001	16,8	8	0,032
	2	2,862	1,3	100,0	0,861	0,259	3,4	3	0,337
TOTALE	1	12,09	68,4	68,4	0,961	0,006	125,7	49	0,000
	2	4,511	25,5	94,0	0,905	0,077	62,7	36	0,004
	3	0,682	3,9	97,9	0,637	0,427	20,8	25	0,701

Tabella 66 – Alcoli alifatici: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
C ₂₂ -OH	-3,867	4,809	3,196	C ₂₂ -OH	-4,259	-14,027	-1,378
C ₂₃ -OH	-26,848	0,675	-1,228	C ₂₃ -OH	1,601	15,342	2,485
C ₂₄ -OH	29,171	-6,895	-1,545	C ₂₄ -OH	-1,433	-1,074	-0,314
C ₂₅ -OH	1,918	2,119	0,670	C ₂₅ -OH	4,073	1,597	-0,653
				C ₂₆ -OH	-0,326	-6,075	1,064
				C ₂₇ -OH	0,754	5,031	-0,633
VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
C ₂₂ -OH	0,971	-0,268	-	C ₂₂ -OH	2,824	-1,958	1,753
C ₂₃ -OH	0,146	0,997	-	C ₂₃ -OH	-2,296	2,835	-0,990
				C ₂₅ -OH	-2,036	0,017	-0,370
				C ₂₆ -OH	3,186	-2,246	1,131
				C ₂₇ -OH	-3,560	0,097	-2,071
				C ₂₈ -OH	2,170	1,930	2,050

Figura 34 – Alcoli alifatici: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.4 – Alcoli triterpenici

Tabella 67 – Alcoli triterpenici: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (ppm).

VARIABILE	CASALIVA				
	Abruzzo		Lombardia		
	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo
Tirucallolo	3,28	4,06	6,88	4,32	5,77
Dammaradienolo	5,34	6,67	12,92	7,34	12,06
β -amirina	20,87	32,60	45,16	34,72	47,81
Butirospermolo	20,69	28,20	47,69	34,07	52,99
α -amirina	5,06	7,67	14,49	13,98	18,91
Cicloartenolo	64,1	115,3	106,5	88,4	129,1
24-metilencicloartanolo	94,6	186,5	166,8	300,7	367,7
Citrostadienolo	71,5	102,9	140,8	144,5	222,5
Ciclobranolo	1,41	1,58	1,69	2,56	2,84
Alcoli triterpenici totali	286,9	485,4	542,9	630,5	859,7

VARIABILE	FRANTOIO							
	Abruzzo		Lombardia			Toscana		
	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo	verde	invaioato	matturo
Tirucallolo	4,02	4,06	3,42	4,86	8,30	3,85	4,88	5,54
dammaradienolo	7,81	8,13	6,25	4,21	18,26	6,49	8,04	9,76
β -amirina	22,34	25,99	28,90	24,82	51,46	29,88	27,37	34,37
Butirospermolo	25,94	29,23	29,11	35,26	68,10	27,15	36,25	40,58
α -amirina	5,36	6,38	10,34	14,07	16,80	7,39	8,91	13,49
Cicloartenolo	63,4	92,8	70,1	91,3	152,4	113,9	189,8	183,7
24-metilencicloartanolo	68,2	135,4	177,3	294,3	300,8	213,4	360,9	554,6
Citrostadienolo	61,1	71,0	116,0	163,9	197,6	130,0	122,3	169,2
Ciclobranolo	1,39	1,42	3,07	1,61	0,48	1,72	1,03	2,31
Alcoli triterpenici totali	259,5	374,3	444,4	634,3	814,2	533,8	759,4	1013,6

VARIABILE	LECCINO							
	Abruzzo		Lombardia			Toscana		
	verde	invaioato	verde	invaioato	matturo	verde	invaioato	matturo
Tirucallolo	5,17	10,75	9,94	7,11	6,82	4,48	6,87	4,85
Dammaradienolo	8,10	15,31	16,27	12,90	14,47	6,48	13,79	7,23
β -amirina	19,62	40,75	42,82	29,86	30,23	26,46	37,75	25,81
Butirospermolo	27,18	47,42	52,62	39,51	41,22	22,87	52,41	24,50
α -amirina	9,79	18,20	19,58	16,62	16,31	11,59	18,46	15,41
Cicloartenolo	124,5	351,5	141,3	103,5	127,0	103,5	385,8	113,6
24-metilencicloartanolo	121,7	400,4	140,3	139,2	218,0	135,6	404,1	296,3
Citrostadienolo	77,4	146,9	154,2	145,0	130,8	99,5	164,7	126,2
Ciclobranolo	1,04	0,63	4,38	2,62	1,54	2,03	2,69	3,49
Alcoli triterpenici totali	394,6	1031,8	581,4	496,4	586,4	412,5	1086,5	617,5

Casaliva in Abruzzo è caratterizzata da bassi contenuti in alcoli triterpenici nella fase “verde”, mentre in Lombardia è distinta per gli alti contenuti soprattutto nella fase “matura” (tabella 67).

Frantoio in Abruzzo è contraddistinto sempre dai bassi valori nella fase “verde”, mentre in Lombardia e Toscana da quelli alti, β -amirina, butirospermolo, α -amirina e citrostadienolo per la prima, e cicloartenolo, 24-metilencicloartanolo ed alcoli totali per la seconda.

Leccino in Abruzzo è rappresentato da alti valori in tirrucallolo e dammaradienolo, e da bassi contenuti in β -amirina, α -amirina, 24-metilencicloartanolo, citrostadienolo, ciclobranolo ed alcoli totali; in Lombardia è distinto per gli alti contenuti in β -amirina, butirrospermolo, α -amirina e ciclobranolo; infine, in Toscana è contrassegnato per i bassi contenuti in tirrucallolo, dammaradienolo e butirrospermolo, e per quelli alti in cicloartenolo, 24-metilencicloartanolo, citrostadienolo ed alcoli totali.

La fase “verde” è caratterizzata dal tirrucallolo, dammaradienolo e butirrospermolo (funzioni 1 e 2), che separano Casaliva e Frantoio della Lombardia da Casaliva e Frantoio dell’Abruzzo e Frantoio e Leccino della Toscana, e dal Leccino dell’Abruzzo e della Lombardia (tabelle 68 e 69, e figura 35).

La fase “invaiaata” è caratterizzata dal dammaradienolo, β -amirina e butirrospermolo (funzioni 1 e 2), che separano Casaliva e Frantoio dell’Abruzzo da quelle della Lombardia e della Toscana, oltre a Leccino abruzzese da quello lombardo e toscano.

La fase “matura” è contraddistinta dal tirrucallolo e dal dammaradienolo (funzione 1), che separano il Leccino toscano dalle rimanenti.

Complessivamente i campioni in tutte le fasi di maturazione sono separati dall’ α -amirina, dal dammaradienolo e dal butirrospermolo (funzione 1 e 2), i quali riescono a differenziare la cultivar Leccino in totale da Casaliva e Frantoio della Lombardia, e da Casaliva e Frantoio dell’Abruzzo e della Toscana.

Tabella 68 – Alcoli triterpenici: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	6,487	61,4	61,4	0,931	0,013	21,7	28	0,795
	2	2,664	25,2	86,6	0,853	0,098	11,6	18	0,866
	3	1,073	10,1	96,7	0,719	0,358	5,1	10	0,882
INVAIATO	1	15,14	66,7	66,7	0,969	0,002	37,3	42	0,676
	2	5,272	23,2	89,9	0,917	0,032	20,6	30	0,899
	3	1,388	6,1	96,0	0,762	0,201	9,6	20	0,975
MATURO	1	1,262	85,3	85,3	0,747	0,363	2,5	8	0,960
	2	0,217	14,7	100,0	0,422	0,822	0,5	3	0,921
TOTALE	1	9,339	65,8	65,8	0,950	0,006	118,5	63	0,000
	2	3,351	23,6	89,5	0,878	0,067	63,6	48	0,065
	3	0,716	5,0	94,5	0,646	0,291	29,0	35	0,752

Tabella 69 – Alcoli triterpenici: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

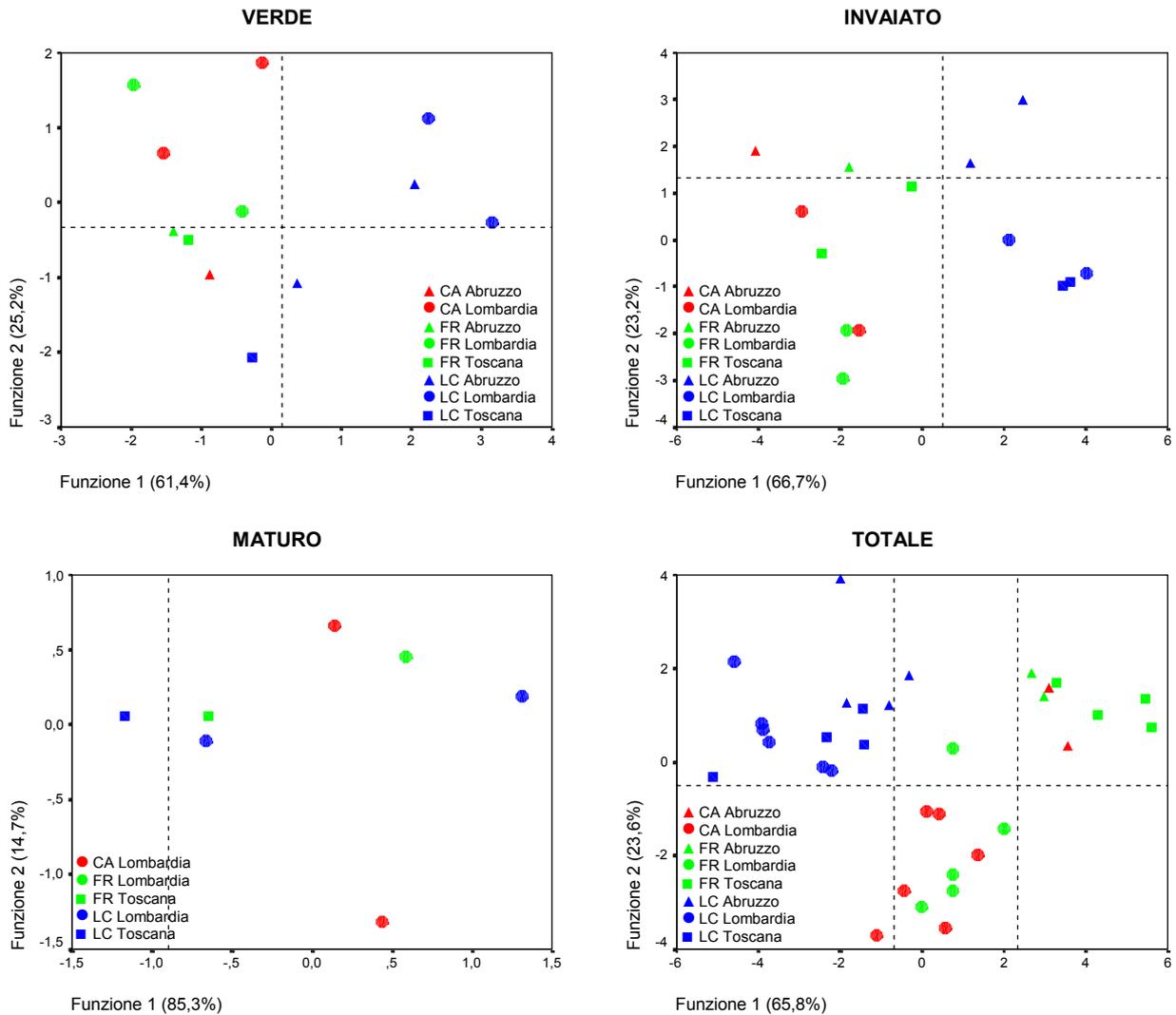
VARIABILI	VERDE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Tirucallolo	6,682	-2,320	4,090
Dammaradienolo	-7,337	-1,784	-6,470
β -amirina	-2,936	-2,516	2,171
Butirrospermolo	3,791	6,910	0,476

VARIABILI	MATURO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Tirucallolo	-3,528	2,873	-
Dammaradienolo	4,073	-2,027	-

VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Dammaradienolo	4,330	1,344	-0,929
β -amirina	-4,702	1,412	-0,272
Butirrospermolo	-2,297	-4,145	-1,042
α -amirina	3,152	-1,500	0,300

VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Tirucallolo	2,263	1,591	1,057
Dammaradienolo	-0,839	2,997	1,825
Butirrospermolo	0,488	-3,176	-1,043
α -amirina	-4,977	-1,801	-1,522
24-metilcicloartanolo	2,813	0,959	0,030

Figura 35 – Alcoli triterpenici: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.5 – Steroli

Tabella 70 – Steroli: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (singoli in % e totali in ppm).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo
Colesterolo			0,25	0,21	0,17	0,13	0,20
Brassicasterolo			0,03	0,04	0,02	0,04	0,04
24-metilencolesterolo			0,05	0,07	0,09	0,15	0,13
Campesterolo			3,42	2,89	3,60	3,07	3,02
Campestanolo			0,07	0,07	0,07	0,09	0,14
Stigmasterolo			1,13	2,09	0,49	0,51	0,45
Δ 7-campesterolo			0,03	0,04	0,02	0,04	0,04
Δ 5,23-stigmastadienolo			0,45	0,47	0,49	0,42	0,40
Clerosterolo			0,45	0,47	0,49	0,42	0,40
β -sitosterolo			83,20	83,43	83,59	83,46	83,13
Sitostanolo			1,04	0,80	1,11	0,48	0,86
Δ 5-avenasterolo			8,32	7,56	8,56	10,12	10,27
Δ 5,24-stigmastadienolo			0,92	0,86	0,75	0,63	0,46
Δ 7-stigmasterolo			0,18	0,46	0,22	0,16	0,18
Δ 7-avenasterolo			0,48	0,52	0,32	0,29	0,28
Eritrodiolo+uvaolo			0,84	1,24	0,54	0,86	0,81
Steroli totali			1284	1366	1291	1390	1275

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo	verde	invaiaato	matturo
Colesterolo			0,24	0,35	0,18	0,22	0,13	0,35	0,14	0,17
Brassicasterolo			0,04	0,04	0,04	0,02	0,01	0,05	0,02	0,03
24-metilencolesterolo			0,03	0,03	0,08	0,14	0,13	0,08	0,06	0,09
Campesterolo			3,41	2,80	3,12	2,92	3,12	2,76	2,56	2,73
Campestanolo			0,12	0,14	0,08	0,08	0,13	0,08	0,10	0,05
Stigmasterolo			0,89	1,63	0,49	0,51	0,41	0,41	0,66	0,59
Δ 7-campesterolo			0,04	0,04	0,04	0,02	0,01	0,05	0,02	0,03
Δ 5,23-stigmastadienolo			0,51	1,00	0,45	0,40	0,43	0,65	0,39	0,53
Clerosterolo			0,51	1,00	0,45	0,40	0,43	0,65	0,40	0,53
β -sitosterolo			84,91	83,73	84,65	83,90	85,01	84,27	82,02	81,71
Sitostanolo			1,55	1,34	1,36	0,97	0,68	1,37	0,60	0,85
Δ 5-avenasterolo			6,25	6,40	7,93	9,38	8,69	7,19	10,78	11,23
Δ 5,24-stigmastadienolo			0,82	1,27	0,67	0,49	0,45	0,85	0,91	0,52
Δ 7-stigmasterolo			0,23	0,06	0,11	0,23	0,17	0,47	0,47	0,50
Δ 7-avenasterolo			0,44	0,17	0,33	0,31	0,19	0,75	0,88	0,45
Eritrodiolo+uvaolo			0,94	1,10	0,58	0,62	0,85	0,68	0,81	0,81
Steroli totali			1484	1308	1378	1336	1452	1133	1357	1149

VARIABILE	LECCINO							
	Abruzzo		Lombardia			Toscana		
	verde	invaio	verde	invaio	matturo	verde	invaio	matturo
Colesterolo	0,20	0,31	0,18	0,17	0,20	0,27	0,14	0,23
Brassicasterolo	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,05	0,01	0,05
24-metilcolesterolo	0,05	0,05	0,07	0,04	0,14	0,09	0,06	0,08
Campesterolo	2,82	2,48	3,47	3,08	2,87	3,21	2,62	2,27
Campestanolo	0,08	0,09	0,12	0,23	0,11	0,21	0,07	0,17
Stigmasterolo	1,25	1,91	0,84	1,08	1,16	0,71	0,83	1,02
$\Delta 7$ -campesterolo	0,06	0,04	0,03	0,03	0,45	0,05	0,02	0,05
$\Delta 5,23$ -stigmastadienolo	0,65	0,68	0,46	0,49	0,54	0,42	0,47	0,36
Clerosterolo	0,65	0,68	0,46	0,49	0,54	0,42	0,47	0,36
β -sitosterolo	82,56	81,16	83,42	80,59	81,35	81,84	78,51	82,51
Sitostanolo	1,19	0,87	1,29	1,02	0,78	1,94	0,84	0,83
$\Delta 5$ -avenasterolo	7,94	8,63	8,43	11,60	10,63	8,20	13,98	10,53
$\Delta 5,24$ -stigmastadienolo	0,93	1,12	0,33	0,50	0,59	0,78	0,93	0,62
$\Delta 7$ -stigmasterolo	0,44	0,57	0,26	0,11	0,23	0,56	0,23	0,28
$\Delta 7$ -avenasterolo	1,16	1,37	0,61	0,55	0,40	1,24	0,83	0,64
Eritrodiolo+uvaolo	0,78	1,27	0,73	0,51	0,60	0,43	0,49	0,96
Steroli totali	1559	1520	1430	1159	1266	1330	1808	1296

In Abruzzo, Casaliva si evidenzia per i bassi quantitativi in campesterolo e $\Delta 5$ -avenasterolo, e per quelli alti in stigmasterolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo ed eritrodiolo+uvaolo; Frantoio si caratterizza per gli alti valori in campesterolo, stigmasterolo, sitostanolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo, eritrodiolo+uvaolo e steroli totali, e per uno basso in $\Delta 5$ -avenasterolo; Leccino si diversifica per gli alti contenuti in stigmasterolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo ed eritrodiolo+uvaolo, e per uno basso in $\Delta 5$ -avenasterolo (tabella 70).

In Lombardia, Casaliva si mette in evidenza per gli alti contenuti in campesterolo e $\Delta 5$ -avenasterolo, e per quelli bassi in stigmasterolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo ed eritrodiolo+uvaolo; Frantoio si differenzia per l'alto valore in β -sitosterolo, e per bassi valori in $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo ed eritrodiolo+uvaolo; Leccino si distingue per i valori alti in campesterolo e β -sitosterolo, e bassi in sitostanolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo e steroli totali.

In Toscana, infine, Frantoio si caratterizza per i bassi valori in campesterolo, β -sitosterolo, sitostanolo e steroli totali, ed uno alto in $\Delta 5$ -avenasterolo; e Leccino si contraddistingue per i bassi contenuti in campesterolo, stigmasterolo, β -sitosterolo ed eritrodiolo+uvaolo, ed alti in sitostanolo, $\Delta 5$ -avenasterolo e steroli totali.

Lo stadio di maturazione "verde" è definito dal colesterolo e dal 24-metilcolesterolo (funzione 1), che separano le cultivar lombarde e toscane da quelle abruzzesi, ad eccezione del suo Leccino (tabelle 71 e 72, e figura 36).

Lo stadio di maturazione "invaio" è definito dal colesterolo, brassicasterolo, e campesterolo (funzioni 1 e 2), che sono in grado di separare Frantoio e Leccino dell'Abruzzo da quelli della Lombardia e della Toscana, e Casaliva abruzzese da quella lombarda.

Lo stadio di maturazione “maturo” è definito principalmente dal brassicasterolo (funzione 1), che separa Leccino e Frantoio lombardo da Frantoio e Leccino toscano, ma non distingue Casaliva della Lombardia. In totale i campioni sono separati dal β -sitosterolo e dal $\Delta 5$ -avenasterolo (funzioni 1 e 2), i quali differenziano bene le regioni e le cultivar, separando Casaliva e Frantoio dell’Abruzzo da quelli della Lombardia e dal Frantoio della Toscana, inoltre sono ben distinti Leccino abruzzese da quello toscano e da quello lombardo.

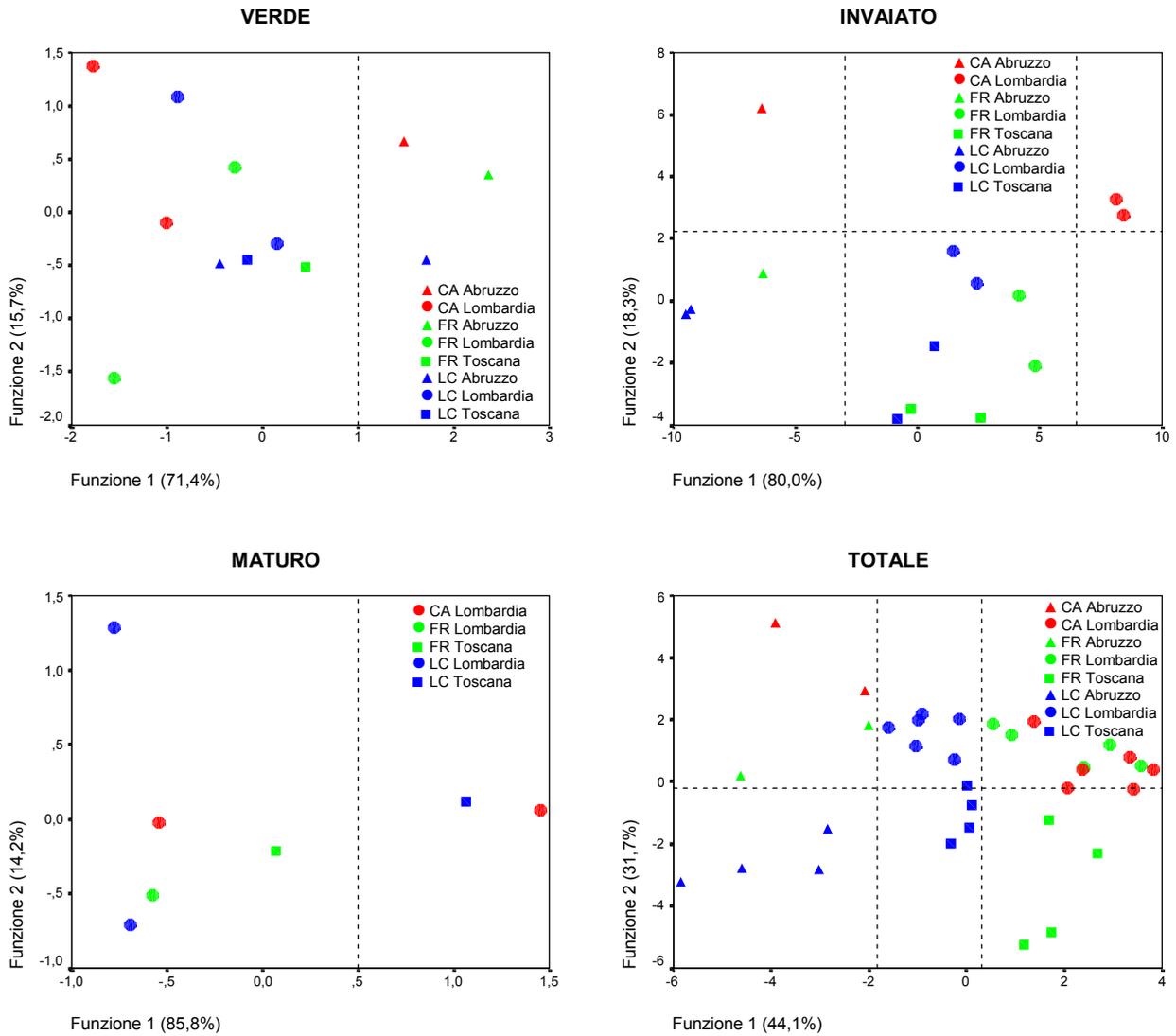
Tabella 71 – Steroli: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	3,674	71,4	71,4	0,887	0,067	13,5	28	0,990
	2	0,807	15,7	87,1	0,668	0,314	5,8	18	0,997
	3	0,422	8,2	95,3	0,545	0,567	2,8	10	0,985
INVAIATO	1	73,78	80,0	80,0	0,993	0,000	50,0	42	0,186
	2	16,91	18,3	98,3	0,972	0,018	24,1	30	0,768
	3	1,162	1,3	99,6	0,733	0,324	6,8	20	0,997
MATURO	1	1,486	85,8	85,8	0,773	0,323	2,8	8	0,945
	2	0,245	14,2	100,0	0,444	0,803	0,5	3	0,908
TOTALE	1	7,602	44,1	44,1	0,940	0,001	141,4	98	0,003
	2	5,459	31,7	75,8	0,919	0,010	96,2	78	0,079
	3	2,141	12,4	88,2	0,826	0,066	57,0	60	0,584

Tabella 72 – Steroli: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Colesterolo	1,324	0,827	-0,789	Colesterolo	-2,914	-2,283	0,704
Brassicasterolo	0,318	-0,875	1,466	Brassicasterolo	2,129	3,195	-0,928
24-metilencolesterolo	-1,694	-0,078	-0,183	Campesterolo	1,681	2,838	-0,010
Campesterolo	0,332	0,797	0,755	Campestanolo	0,280	-2,649	-0,656
				Stigmasterolo	-1,724	0,767	0,148
VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Colesterolo	-0,525	1,147	-	Campesterolo	0,899	1,985	1,376
Brassicasterolo	1,230	-0,284	-	Stigmasterolo	-0,239	2,638	0,543
				β -sitosterolo	7,004	11,041	5,931
				Sitostanolo	0,278	2,659	0,552
				$\Delta 5$ -avenasterolo	7,053	10,768	5,539
				$\Delta 7$ -stigmasterolo	1,052	0,054	0,831

Figura 36 – Steroli: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.6 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti e stabilità ossidativa

Tabella 73 – Polifenoli, tocoferoli, pigmenti: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (ppm)
Stabilità ossidativa: valore per cultivar, regione e stadio di maturazione (giorni/kg).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiano	verde	invaiano	matturo
Idrossitirosolo			20,64	5,14	3,45	1,39	0,93
Tirosolo			28,23	7,86	4,48	2,75	2,03
Vanillico			2,67	0,32	6,23	5,21	4,11
Polifenoli totali			425,4	300,7	229,5	280,0	195,2
α tocoferolo			171,8	156,8	176,4	176,5	153,1
β tocoferolo			2,06	5,44	3,51	3,26	2,08
γ tocoferolo			2,65	7,37	2,82	2,26	1,95
Tocoferoli totali			176,5	169,6	182,8	182,0	157,1
Carotenoidi totali			6,01	5,19	4,80	6,68	5,68
Clorofille totali			7,93	4,41	4,90	7,92	4,62
Fitolo			178,4	201,0	162,4	189,2	179,6
Stabilità ossidativa			94,26	63,75	73,79	100,96	61,18

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiano	verde	invaiano	matturo	verde	invaiano	matturo
Idrossitirosolo			3,79	2,59	2,93	1,75	0,33	3,77	3,45	6,64
Tirosolo			6,31	7,24	4,03	2,48	1,07	4,48	5,06	7,07
Vanillico			0,40	1,54	5,09	4,65	3,65	3,51	1,29	2,01
Polifenoli totali			248,5	263,0	208,3	248,4	151,3	347,8	347,8	363,7
α tocoferolo			161,4	129,1	176,2	161,3	182,9	140,5	128,2	124,4
β tocoferolo			2,30	1,60	3,50	2,76	8,15	2,33	1,84	2,78
γ tocoferolo			2,40	1,69	2,36	1,96	1,15	2,31	3,06	3,54
Tocoferoli totali			166,1	132,4	182,1	166,0	192,2	145,1	133,1	130,8
Carotenoidi totali			5,69	4,65	7,19	7,03	9,55	4,68	3,20	2,35
Clorofille totali			7,32	6,24	9,07	7,06	8,01	6,80	3,32	2,69
Fitolo			241,1	269,8	121,3	197,8	191,6	293,3	310,4	338,5
Stabilità ossidativa			83,97	56,52	77,45	81,62	58,59	109,71	97,75	116,20

VARIABILE	LECCINO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiano	verde	invaiano	matturo	verde	invaiano	matturo
Idrossitirosolo			7,47	4,12	4,71	1,00	1,52	13,22	11,30	4,35
Tirosolo			6,70	6,12	4,97	4,57	6,35	8,42	3,77	4,49
Vanillico			1,14	0,59	3,05	3,84	3,22	2,12	0,46	0,65
Polifenoli totali			266,6	130,6	218,3	190,3	225,8	477,7	414,7	433,9
α tocoferolo			356,6	320,2	370,9	298,7	322,1	351,0	216,6	305,3
β tocoferolo			5,94	3,83	7,18	4,15	10,55	7,13	1,49	1,88
γ tocoferolo			15,73	18,01	12,00	8,19	11,37	18,44	8,53	15,51
Tocoferoli totali			378,3	342,1	390,1	311,0	344,0	376,5	226,7	322,7
Carotenoidi totali			5,43	5,11	9,88	5,40	5,03	4,89	3,94	2,22
Clorofille totali			5,24	4,17	11,81	4,28	4,76	5,86	3,66	2,70
Fitolo			377,3	324,6	210,7	185,7	153,6	266,4	238,2	213,5
Stabilità ossidativa			108,17	59,74	122,84	119,83	98,37	161,39	142,06	187,33

Casaliva dell'Abruzzo possiede alti valori in idrossitirosolo, tirosolo, polifenoli totali, γ tocoferolo e fitolo, ed uno basso in vanillico; mentre quella della Lombardia possiede bassi valori in idrossitirosolo, tirosolo, polifenoli totali, γ tocoferolo e fitolo, ed uno alto in vanillico (tabella 73).

Frantoio dell'Abruzzo è caratterizzato da un alto contenuto in tirosolo, e bassi in vanillico, β tocoferolo e stabilità ossidativa; quello della Lombardia spicca per bassi valori in idrossitirosolo, tirosolo, polifenoli totali, γ tocoferolo e fitolo, e per alti valori in vanillico, α tocoferolo, β tocoferolo, tocoferoli totali, carotenoidi totali e clorofille totali; e quello della Toscana si evidenzia per le quantità elevate in idrossitirosolo, polifenoli totali, γ tocoferolo, fitolo e stabilità ossidativa.

Leccino dell'Abruzzo possiede valori bassi in polifenoli totali e stabilità ossidativa, ed uno alto in fitolo; quello della Lombardia si caratterizza per i bassi contenuti in idrossitirosolo, γ tocoferolo e fitolo, e per quelli alti in vanillico, α tocoferolo, β tocoferolo, tocoferoli totali, carotenoidi totali e clorofille totali; Leccino toscano si diversifica per gli alti valori in idrossitirosolo, polifenoli totali, γ tocoferolo e stabilità ossidativa, e per quelli bassi in vanillico, α tocoferolo, β tocoferolo, tocoferoli totali, carotenoidi totali e clorofille totali.

La fase di maturazione "verde" è caratterizzata dall'idrossitirosolo, dal tirosolo e dal vanillico (funzione 1), oltre che dal vanillico e dai polifenoli totali (funzione 2). Questi composti separano Casaliva e Frantoio della Lombardia e Toscana da quelli dell'Abruzzo, e Leccino toscano da quello lombardo ed abruzzese (tabelle 74 e 75, e figura 37).

La fase di maturazione "invaiaata" è caratterizzata dall'idrossitirosolo, dal tirosolo, dal vanillico dai polifenoli totali, dall' α tocoferolo e dal γ tocoferolo (funzioni 1 e 2), che distinguono le cultivar di Leccino nelle tre regioni, e Casaliva e Frantoio dell'Abruzzo da quelle lombarde e toscane.

La fase di maturazione "matura" è caratterizzata dall'idrossitirosolo e dal tirosolo (funzione 1 e 2), che separano Casaliva e Frantoio della Lombardia da quello della Toscana, e Leccino lombardo da quello toscano.

Nel complesso i campioni sono caratterizzati dall'idrossitirosolo, dall' α -tocopherolo e dalle clorofille totali (funzione 1), oltre che dal vanillico e dall' α tocoferolo (funzione 2). Queste separano Casaliva e Frantoio della Lombardia da quelli dell'Abruzzo e della Toscana, e Leccino lombardo da quello abruzzese e toscano.

Tabella 74 – Polifenoli, tocoferoli e pigmenti: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	1899	98,3	98,3	1,000	0,000	71,5	28	0,000
	2	19,63	1,0	99,3	0,975	0,001	33,8	18	0,013
	3	11,79	0,6	99,9	0,960	0,024	18,6	10	0,045
INVAIATO	1	1195	84,1	84,1	1,000	0,000	98,3	42	0,000
	2	202,4	14,2	98,4	0,998	0,000	55,8	30	0,003
	3	22,30	1,6	99,9	0,978	0,019	23,9	20	0,248
MATURO	1	166,7	95,8	95,8	0,997	0,001	18,1	8	0,020
	2	7,330	4,2	100,0	0,938	0,120	5,3	3	0,151
TOTALE	1	19,56	61,2	61,2	0,975	0,000	182,8	63	0,000
	2	7,325	22,9	84,2	0,938	0,009	111,7	48	0,000
	3	3,671	11,5	95,7	0,887	0,072	61,9	35	0,003

Tabella 75 – Polifenoli, tocoferoli e pigmenti: coefficienti delle funzioni per gli stadi di maturazioni.

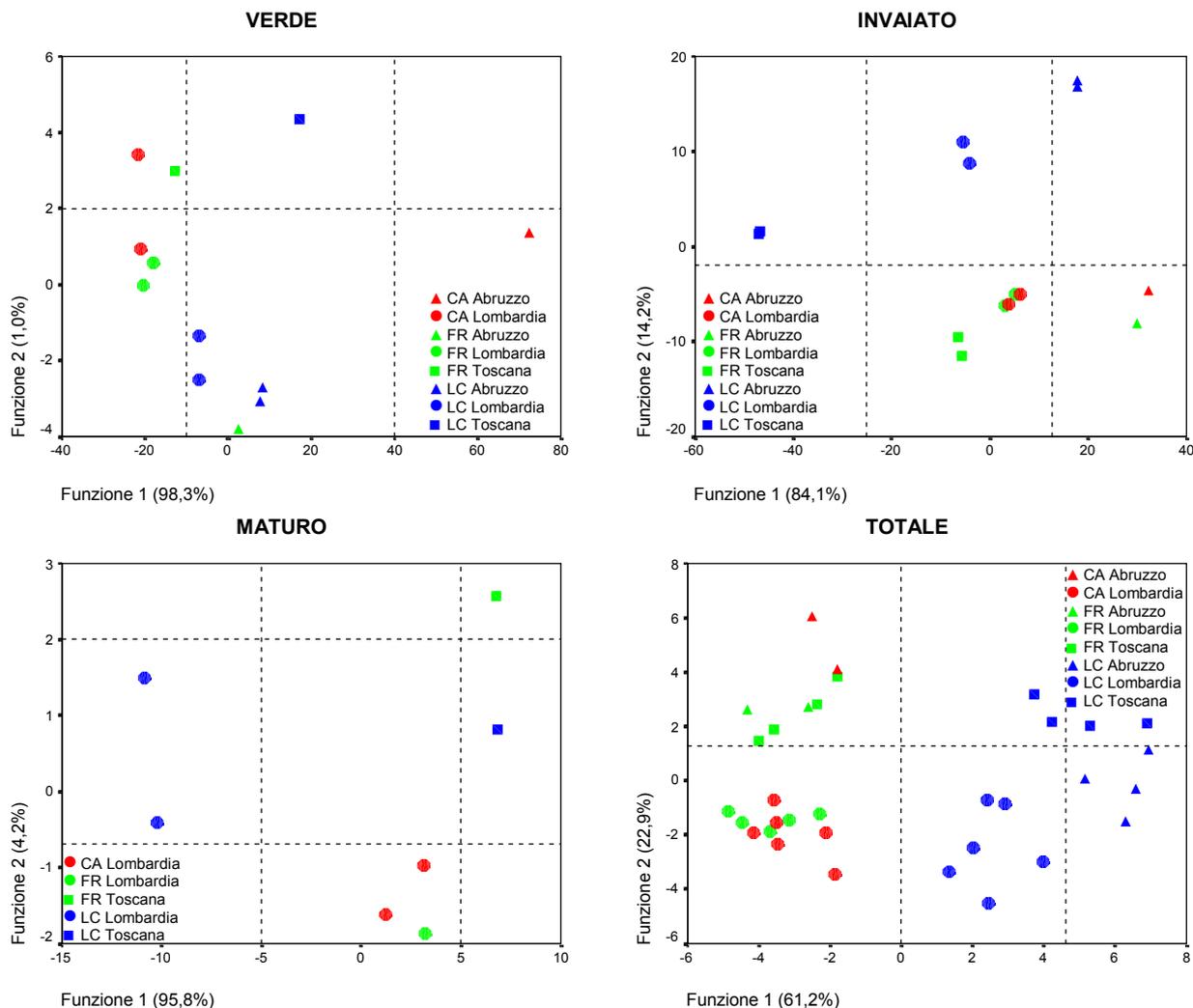
VARIABILI	VERDE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Idrossitirosole	2,148	-0,141	0,100
Tirosole	2,600	-0,056	0,298
Vanillico	-2,512	0,835	0,464
Polifenoli totali	-0,314	0,884	-0,568

VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Idrossitirosole	6,890	3,268	1,775
Tirosole	25,186	-0,069	1,936
Vanillico	18,744	-0,283	0,996
Polifenoli totali	-9,642	-2,156	0,644
α tocoferolo	-14,817	3,356	-1,798
γ tocoferolo	22,547	0,069	4,093

VARIABILI	MATURO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Idrossitirosole	5,096	0,452	-
Tirosole	-5,086	0,553	-

VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Idrossitirosole	1,321	-0,117	0,843
Tirosole	-0,731	0,577	-1,434
Vanillico	-0,290	-0,782	0,555
Polifenoli totali	-0,196	0,643	0,669
α tocoferolo	1,394	-0,971	-0,136
γ tocoferolo	0,335	0,655	0,289
Clorofille totali	-1,074	0,615	-0,060

Figura 37 – Polifenoli, tocoferoli e pigmenti: punteggi delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.7 – Composti volatili

Tabella 76 – Composti volatili: composizione per cultivar, regione e stadio di maturazioni (ppm).

VARIABILE	CASALIVA						
	Abruzzo		Lombardia				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo
<i>n</i> -ottano			153,58	24,00	62,18	9,91	16,75
Etil acetato			5,76	7,14	8,26	6,57	7,76
2-metilbutanale			10,33	11,88	1,99	2,98	1,00
3-metilbutanale			13,30	13,14	2,13	5,40	1,31
Etanolo			3,37	7,39	6,56	19,46	9,28
Pentan-3-one			9,47	10,94	19,30	16,40	5,43
1-penten-3-one			6,32	3,59	14,55	12,36	5,34
Esanale			51,37	60,20	129,87	47,78	76,59
2-metil-1-propanolo			0,70	0,71	0,82	0,89	0,36
<i>trans</i> -2-pentenale			9,04	6,17	10,50	9,11	5,35
1-penten-3-olo			43,14	29,88	50,81	45,98	24,16
3-metil-1-butanolo			11,84	8,15	14,17	9,08	11,50
<i>trans</i> -2-esenale			1256	1047	1953	1359	1252
1-pentanolo			0,52	0,57	0,91	1,11	0,69
<i>cis</i> -2-penten-1-olo			27,55	18,88	29,68	26,89	15,98
1-esanolo			2,50	4,19	6,76	23,01	22,95
<i>cis</i> -3-esen-1-olo			9,86	10,67	42,65	33,86	38,46
<i>trans</i> -2-esenolo			17,43	31,72	34,90	79,86	45,56
Acido acetico			0,52	0,57	0,49	0,56	0,67
1-ottanolo			0,21	0,57	0,48	0,56	0,68
Aromi totali			1633	1297	2390	1711	1541

VARIABILE	FRANTOIO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaato	verde	invaiaato	matturo	verde	invaiaato	matturo
<i>n</i> -ottano			112,99	40,19	159,49	17,84	2,96	44,32	15,31	7,39
Etil acetato			7,11	7,11	8,16	6,50	5,97	16,22	8,53	6,50
2-metilbutanale			4,93	10,41	1,37	2,03	0,82	5,27	4,26	6,79
3-metilbutanale			6,35	11,77	1,00	2,97	1,58	8,02	6,82	8,52
Etanolo			3,40	6,37	7,92	6,80	9,82	8,77	14,68	7,88
Pentan-3-one			5,64	17,43	22,11	15,66	4,01	8,47	9,35	28,46
1-penten-3-one			7,50	5,58	10,66	10,66	1,66	5,33	3,06	3,62
Esanale			73,49	83,24	125,44	63,16	57,87	47,66	61,98	44,92
2-metil-1-propanolo			0,63	0,67	1,23	0,61	0,31	0,70	0,50	0,67
<i>trans</i> -2-pentenale			6,20	8,16	10,03	10,20	3,57	7,73	7,47	9,73
1-penten-3-olo			33,01	38,06	51,17	42,32	22,21	39,67	32,25	39,96
3-metil-1-butanolo			11,86	13,85	12,00	11,38	9,97	8,30	15,81	7,63
<i>trans</i> -2-esenale			1443	1627	1567	1292	854	1101	855	977
1-pentanolo			0,63	0,55	1,27	1,02	0,92	0,53	3,14	1,05
<i>cis</i> -2-penten-1-olo			25,68	22,56	29,67	23,94	16,44	24,26	18,74	23,29
1-esanolo			2,48	5,28	13,25	6,62	31,66	6,00	6,84	11,03
<i>cis</i> -3-esen-1-olo			16,66	17,61	37,45	11,70	51,25	15,87	5,32	6,78
<i>trans</i> -2-esenolo			22,10	56,63	59,98	28,78	46,93	11,08	11,11	24,79
Acido acetico			0,63	0,55	0,50	0,33	0,12	0,51	5,04	0,52
1-ottanolo			0,38	0,55	0,64	0,43	0,71	0,51	4,50	0,52
Aromi totali			1785	1973	2120	1555	1123	1360	1090	1217

VARIABILE	LECCINO									
	Abruzzo		Lombardia			Toscana				
	Regione	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo	verde	invaiaio	matturo
<i>n</i> -ottano			10,05	51,09	12,62	2,36	4,04	23,50	11,59	2,71
Etil acetato			8,66	19,76	6,87	8,24	13,20	16,82	12,91	6,85
2-metilbutanale			20,13	15,78	4,28	3,99	5,43	2,59	4,09	10,28
3-metilbutanale			22,99	20,11	6,40	7,28	6,87	5,04	7,57	16,02
Etanolo			7,36	22,91	5,89	8,97	15,35	11,53	21,84	5,25
Pentan-3-one			8,25	46,01	18,51	16,63	7,57	3,19	11,73	8,07
1-penten-3-one			5,79	6,42	12,75	12,17	4,31	4,72	6,93	8,04
Esanale			140,64	93,27	46,36	37,31	32,05	33,74	28,01	15,23
2-metil-1-propanolo			0,52	0,97	1,31	1,40	0,39	0,41	0,94	0,61
<i>trans</i> -2-pentenale			4,70	4,11	8,61	7,55	4,86	2,77	6,14	6,34
1-penten-3-olo			25,48	23,29	39,33	22,68	12,73	17,40	20,11	15,16
3-metil-1-butanolo			10,52	68,63	9,50	10,26	7,82	5,24	25,45	5,81
<i>trans</i> -2-esenale			895	260	1194	1139	589	631	636	504
1-pentanolo			7,21	9,74	0,76	0,79	1,09	0,40	1,02	0,41
<i>cis</i> -2-penten-1-olo			12,86	9,75	22,70	15,42	9,44	7,23	18,13	9,67
1-esanolo			6,04	55,15	8,56	9,83	61,87	3,68	9,44	2,61
<i>cis</i> -3-esen-1-olo			6,26	20,74	17,76	19,15	40,92	4,18	27,15	2,39
<i>trans</i> -2-esenolo			20,54	202,26	39,89	59,20	59,78	9,50	12,94	10,55
Acido acetico			7,25	6,32	0,45	0,31	0,43	0,41	0,64	0,41
1-ottanolo			7,55	1,76	0,61	0,60	0,42	0,41	0,60	0,72
Aromi totali			1228	939	1457	1384	877	783	863	631

In Abruzzo, Casaliva si distingue per valori alti in *n*-ottano, 2-metilbutanale e 3-metilbutanale, e bassi in etanolo, 1-penten-3-one, 3-metil-1-butanolo, *trans*-2-esenale, 1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esenolo ed aromi totali; Frantoio si caratterizza per alti contenuti in 2-metilbutanale, 3-metilbutanale e *trans*-2-esenale, e bassi in etanolo ed 1-esanolo; Leccino si differenzia per alti quantitativi in *n*-ottano, etil acetato, 2-metilbutanale, 3-metilbutanale, etanolo, pentan-3-one, esanale, 3-metil-1-butanolo, 1-pentanolo e *trans*-2-esenolo, ed uno basso in *trans*-2-esenale (tabella 76).

In Lombardia, Casaliva si caratterizza per bassi contenuti in *n*-ottano, 2-metilbutanale e 3-metilbutanale, ed alti in etanolo, 1-penten-3-one, 3-metil-1-butanolo, *trans*-2-esenale, 1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esenolo ed aromi totali; Frantoio si distingue per bassi contenuti in etil acetato, 2-metilbutanale, 3-metilbutanale e *trans*-2-esenale, ed alti in esanale, 1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esenolo ed aromi totali; Leccino si evidenzia per un basso quantitativo in *n*-ottano, ed alti in *trans*-2-pentenale, *trans*-2-esenale, *cis*-2-penten-1-olo, 1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo ed aromi totali.

In Toscana, Frantoio si differenzia per alti contenuti in etil acetato ed etanolo, e bassi in esanale, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esenolo ed aromi totali; Leccino si evidenzia per bassi valori in etil acetato, 2-metilbutanale, 3-metilbutanale, etanolo, pentan-3-one, esanale, *trans*-2-pentenale, 3-metil-1-butanolo, 1-pentanolo, *cis*-2-penten-1-olo, 1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esenolo ed aromi totali.

L'epoca "verde" è caratterizzata principalmente dall'etil acetato e 3-metilbutanale (funzione 1), e secondariamente dal 2-metilbutanale e 3-metilbutanale (funzione 2), riuscendo così a separare le cultivar Leccino e Frantoio nelle tre regioni e Casaliva dell'Abruzzo, ma non Casaliva della Lombardia (tabelle 77 e 78, e figura 38).

L'epoca "invaiaata" è caratterizzata dall'etil acetato e 2-metilbutanale (funzione 1), e secondariamente dal 2-metilbutanale e 3-metilbutanale (funzione 2), che separano la cultivar Leccino in base alle regioni, e le cultivar Casaliva e Frantoio della Lombardia e Toscana da quelle dell'Abruzzo.

L'epoca "matura" è caratterizzata dal *n*-ottano e dall'etil acetato (funzione 1), che differenzia Leccino della Lombardia da quello toscano, e Casaliva della Lombardia da Frantoio della Toscana e della Lombardia.

Nel totale i campioni di olio sono ben differenziati in base al 2-metilbutanale, 3-metilbutanale, 1-pentanol, *trans*-2-esenolo, acido acetico ed 1-ottanol (funzione 1 e 2), che distinguono Casaliva della Lombardia da quella Toscana, Frantoio abruzzese e lombardo da quello toscano, e Leccino lombardo da quello toscano e da quello abruzzese.

Tabella 77 – Composti volatili: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

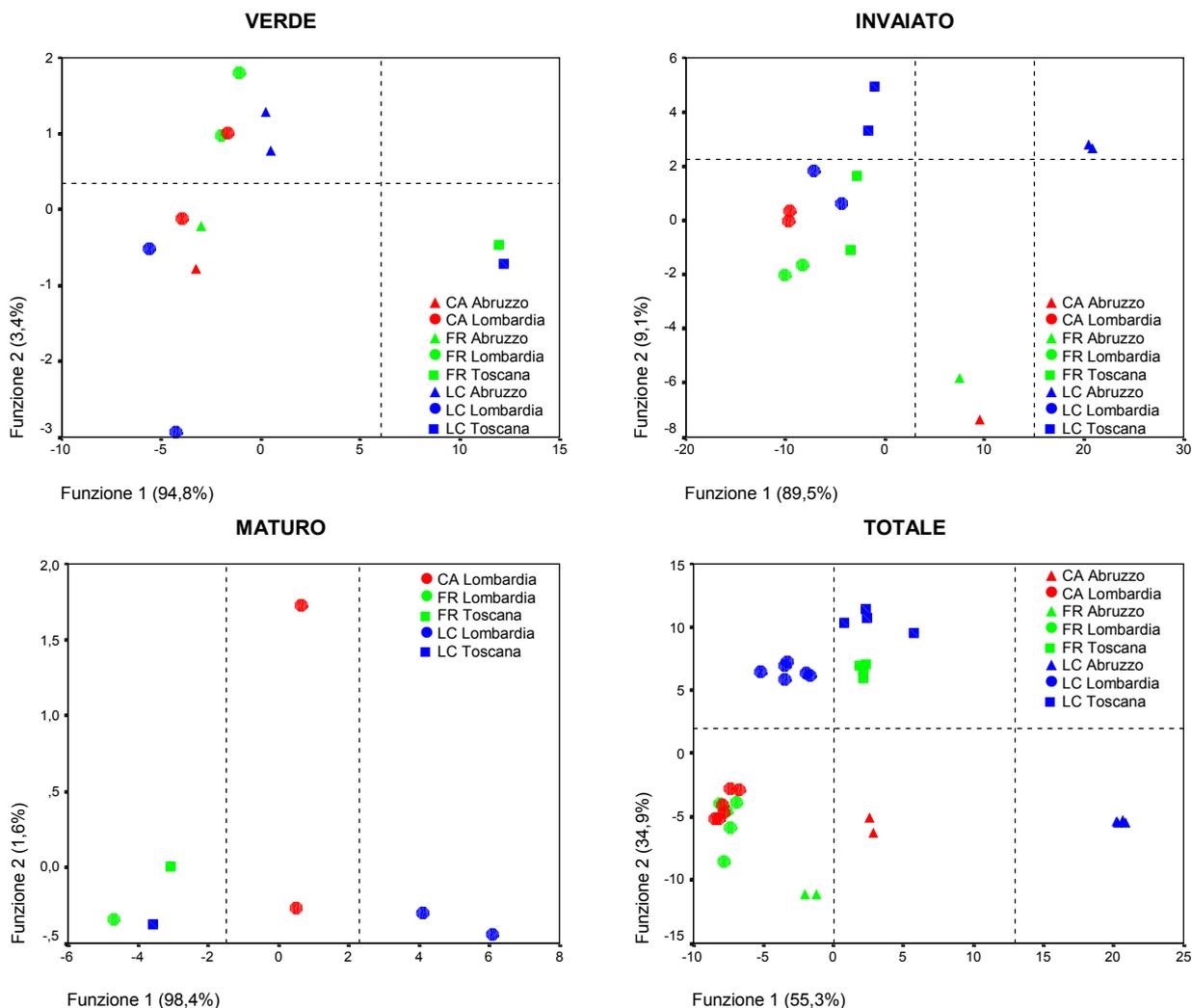
Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	95,21	94,8	94,8	0,995	0,001	36,3	28	0,135
	2	3,407	3,4	98,2	0,879	0,068	13,5	18	0,763
	3	1,401	1,4	99,6	0,764	0,298	6,1	10	0,811
INVAIATO	1	241,0	89,5	89,5	0,998	0,000	64,9	42	0,013
	2	24,52	9,1	98,6	0,980	0,005	31,9	30	0,370
	3	2,826	1,0	99,6	0,859	0,124	12,5	20	0,898
MATURO	1	48,60	98,4	98,4	0,990	0,011	11,2	8	0,190
	2	0,793	1,6	100,0	0,665	0,558	1,5	3	0,692
TOTALE	1	98,35	55,3	55,3	0,995	0,000	261,0	140	0,000
	2	62,17	34,9	90,2	0,992	0,000	178,2	114	0,000
	3	11,14	6,3	96,5	0,958	0,003	103,6	90	0,155

Tabella 78 – Composti volatili: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
<i>n</i> -ottano	2,067	0,639	-0,469	Etil acetato	5,845	3,398	-3,081
Etil acetato	3,017	0,289	-0,041	2-metilbutanale	6,366	-10,344	-1,320
2-metilbutanale	-2,797	12,769	0,419	3-metilbutanale	2,829	13,926	0,802
3-metilbutanale	4,724	-12,474	0,438	Pentan-3-one	-3,237	0,350	1,837

VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
<i>n</i> -ottano	2,569	0,970	-	2-metilbutanale	-4,062	-9,995	-0,118
Etil acetato	2,746	-0,033	-	3-metilbutanale	9,996	11,193	0,661
				Pentan-3-one	2,395	6,849	1,348
				Esanale	0,552	-5,489	-1,252
				3-metil-1-butano	-3,845	-6,776	-4,227
				1-pentano	7,077	1,523	-3,774
				<i>cis</i> -2-penten-1-olo	-0,228	-8,919	4,828
				<i>cis</i> -3-esen-1-olo	0,289	6,320	-1,674
				<i>trans</i> -2-esenolo	-4,160	-11,490	-0,981
				Acido acetico	4,383	14,689	14,214
				1-ottano	-6,526	-10,596	-8,367

Figura 38 – Composti volatili: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



4.5.8 – Variabili chemiometriche caratterizzanti

I coefficienti più rappresentativi delle funzioni discriminanti sono indicati nella tabella 79 (valori in grassetto).

La composizione in acidi grassi è risultata utile per separare le cultivar e le provenienze regionali: Leccino lombardo da quello toscano e da quello abruzzese, Casaliva e Frantoio della Lombardia da quelli dell'Abruzzo e della Toscana, principalmente in base ai rapporti tra gli acidi grassi oleico, linoleico ed eicosenoico (funzioni 1 e 2).

I trigliceridi più interessanti per separare le cultivar e le regioni sono soprattutto POL+P_oPO e OOO (funzioni 1 e 2), questi composti separano Frantoio della Lombardia da quello toscano ed abruzzese, Leccino dell'Abruzzo da quello lombardo e quello toscano, ma non separano le regioni per la cultivar Casaliva.

Le cultivar e le regioni sono caratterizzate maggiormente dai seguenti alcoli alifatici: tricosanolo, esacosanolo ed eptacosanolo (funzioni 1 e 2). Frantoio della Toscana è distinto da quello lombardo ed abruzzese, e così pure Leccino toscano dagli altri, mentre la Casaliva dell'Abruzzo e della Lombardia risultano indistinte.

Gli alcoli triterpenici dammaradienolo, butirrospermolo ed α -amirina (funzioni 1 e 2) separano Casaliva e Frantoio della Lombardia da quelli abruzzesi e toscani, e Leccino nelle tre regioni in un unico gruppo.

La composizione in steroli è risultata utile per separare Casaliva e Frantoio dell'Abruzzo da quelli della Lombardia e della Toscana, così pure per Leccino abruzzese da quello toscano e lombardo. I più significativi sono stati: β -sitosterolo e Δ^5 -avenasterolo (funzioni 1 e 2).

I contenuti in polifenoli, tocoferoli, pigmenti e la stabilità ossidativa sono stati in grado di separare le cultivar Casaliva e Frantoio della Lombardia da quelle abruzzesi e toscane, e la cultivar Leccino lombarda da quella della toscana e da quella dell'abruzzo, in base ai rapporti tra vanillico, α tocoferolo e clorofille totali (funzioni 1 e 2).

I composti volatili, infine, risultano molto utili nella separazione sia delle cultivar che delle regioni. Il 2-metilbutanale, il 3-metilbutanale, l'1-pentanol, il *trans*-2-esenolo, l'acido acetico e l'1-ottanol (funzioni 1 e 2) separano Leccino lombardo da quello toscano e da quello abruzzese, Casaliva della Lombardia da quella abruzzese, e Frantoio della Toscana da quello lombardo ed abruzzese.

Tabella 79 – Variabili chemiometriche: coefficienti delle funzioni discriminanti per cultivar - regione.

VARIABILE	Funzione 1	Funzione 2	VARIABILE	Funzione 1	Funzione 2
Acidi grassi: M – miristico C_{14:0}	-	-	Steroli: colesterolo	-	-
P – palmitico C_{16:0}	4,127	-0,181	brassicasterolo	-	-
P_o – palmitoleico C_{16:1}	3,594	0,824	24-metilcolesterolo	-	-
E_a – eptadecanoico C_{17:0}	-	-	campesterolo	0,899	1,985
E_b – eptadecenoico C_{17:1}	-	-	campestanolo	-	-
S – stearico C_{18:0}	2,032	1,523	stigmasterolo	-0,239	2,638
O – oleico C_{18:1}	11,544	2,153	Δ7-campesterolo	-	-
L – linoleico C_{18:2}	10,419	2,474	Δ5,23-stigmastadienolo	-	-
L_n – linolenico C_{18:3}	-	-	clorosterolo	-	-
A – arachico C_{20:0}	0,863	-1,231	β-sitosterolo	7,004	11,041
E_c – eicosenoico C_{20:1}	0,760	2,344	sitostanolo	0,278	2,659
B – behenico C_{22:0}	-	-	Δ5-avenasterolo	7,053	10,768
L_g – lignocerico C_{24:0}	-	-	Δ5,24-stigmastadienolo	-	-
Trigliceridi: LLL	4,108	2,609	Δ7-stigmasterolo	1,052	0,054
OLL_n+P_oP_oL	-2,388	-0,150	Δ7-avenasterolo	-	-
PLL_n	-	-	eritrodiole+uvaolo	-	-
OLL	-5,919	-2,034	Polifenoli: idrossitirosole	1,321	-0,117
OOL_n+P_oOL+PLL	0,650	-4,908	tirosole	-0,731	0,577
POL_n	-1,551	1,390	vanillico	-0,290	-0,782
E_sOL	-	-	totali	-0,196	0,643
OOL+P_oOO	-2,731	-4,645	Tocoferoli: α tocoferolo	1,394	-0,971
POL+P_oPO	18,440	11,830	β tocoferolo	-	-
PPL	-3,667	-2,601	γ tocoferolo	0,335	0,655
E_sOO	-	-	Pigmenti: carotenoidi totali	-	-
E_sOP	-	-	clorofille totali	-1,074	0,615
OOO	12,346	1,007	fitolo	-	-
POO+SOL	-	-	Stabilità ossidativa	-	-
PPO+PSL	4,464	-3,560	Aromi: n-ottano	-	-
E_sOO	-	-	etil acetato	-	-
E_cOO	-	-	2-metilbutanale	-4,062	-9,995
SOO	-	-	3-metilbutanale	9,996	11,193
PSO	-	-	etanolo	-	-
AOO	-	-	pentan-3-one	2,395	6,849
SSO	-	-	1-penten-3-one	-	-
Alcoli alifatici: docosano C₂₂-OH	2,824	-1,958	esanale	0,552	-5,489
tricosano C₂₃-OH	-2,296	2,835	2-metil-1-propanolo	-	-
tetracosano C₂₄-OH	-	-	trans-2-pentenale	-	-
pentacosano C₂₅-OH	-2,036	0,017	1-penten-3-olo	-	-
esacosano C₂₆-OH	3,186	-2,246	3-metil-1-butanolo	-3,845	-6,776
eptacosano C₂₇-OH	-3,560	0,097	trans-2-esenale	-	-
ottacosano C₂₈-OH	2,170	1,930	1-pentanolo	7,077	1,523
Alcoli triterpenici: tirucallo	2,263	1,591	cis-2-penten-1-olo	-0,228	-8,919
dammaradienolo	-0,839	2,997	1-esanolo	-	-
β-amirina	-	-	cis-3-esen-1-olo	0,289	6,320
butirrospermolo	0,488	-3,176	trans-2-esenolo	-4,160	-11,490
α-amirina	-4,977	-1,801	acido acetico	4,383	14,689
cicloartenolo	-	-	1-ottanolo	-6,526	-10,596
24-metilcicloartanolo	2,813	0,959			
citrostadienolo	-	-			
ciclobranolo	-	-			

- coefficienti delle funzioni discriminanti non significativi

4.5.9 – Stabilità ossidativa

La stabilità ossidativa risulta correlata ai contenuti in polifenoli e i tocoferoli totali, ed al rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi.

Nella tabella 80 sono indicati i coefficienti delle regressioni multiple e lineari tra la stabilità ossidativa (Ra) ed il contenuto in polifenoli totali (Pf), tocoferoli totali (To) e rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi (S/P) per tutte le cultivar, con i relativi errori standard, le significatività ed i coefficienti di regressione e di determinazione.

La stabilità ossidativa (Ra) è risultata correlata al contenuto in polifenoli totali (Pf), con la cultivar Leccino che mostra valori quasi sempre sopra la media (figura 39).

La cultivar Leccino è la più resistente all'ossidazione per il suo contenuto elevato in tocoferoli, a parità di polifenoli con le altre cultivar, mentre le cultivar toscane hanno valori di stabilità ossidativa più alti rispetto alle stesse cultivar nelle altre regioni, a motivo del contenuto in polifenoli (figura 40).

La stabilità ossidativa è risultata correlata anche al rapporto tra gli acidi grassi saturi su polinsaturi (S/P), riportando la relazione: $Ra = -57,448 + 0,263 \cdot Pf + 0,123 \cdot To + 22,979 \cdot S/P$ ($r = 0,880$ e $r^2 = 0,774$).

La stabilità ossidativa (Ra) è risultata correlata al contenuto in tocoferoli totali (To), con la cultivar Leccino che conferma il più alto contenuto in tocoferoli, e quello toscano con una stabilità molto sopra della media (figura 41).

La stabilità ossidativa (Ra) è risultata inoltre correlata al rapporto tra gli acidi grassi saturi su polinsaturi (S/P), la quale conferma ulteriormente l'alta stabilità per gli oli toscani e l'elevato contenuto saturi su polinsaturi della cultivar Leccino (figura 42).

Tabella 80 – Stabilità ossidativa (Ra): coefficienti e valori statistici della regressione per cultivar - regione.

Modello	Intercetta e variabili indipendenti	Coefficienti	Errore std.	Sig.	r	r ²
1	(Intercetta)	34,268	13,760	0,018	0,660	0,436
	Polifenoli totali (Pf)	0,234	0,048	0,000		
2	(Intercetta)	-19,222	13,740	0,172	0,850	0,722
	Polifenoli totali (Pf)	0,259	0,034	0,000		
	Tocoferoli totali (To)	0,198	0,036	0,000		
3	(Intercetta)	-57,448	19,520	0,006	0,880	0,774
	Polifenoli totali (Pf)	0,263	0,032	0,000		
	Tocoferoli totali (To)	0,123	0,044	0,009		
	Acidi grassi saturi / polinsaturi (S/P)	22,979	8,954	0,016		
4	(Intercetta)	58,801	15,041	0,000	0,446	0,199
	Tocoferoli totali (To)	0,164	0,059	0,009		
5	(Intercetta)	19,118	29,380	0,520	0,439	0,193
	Acidi grassi saturi / polinsaturi (S/P)	32,863	12,082	0,011		

Figura 39 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed il contenuto in polifenoli totali:

$$Ra=34,3+0,23*Pf \quad (r=0,660 \text{ e } r^2=0,436);$$

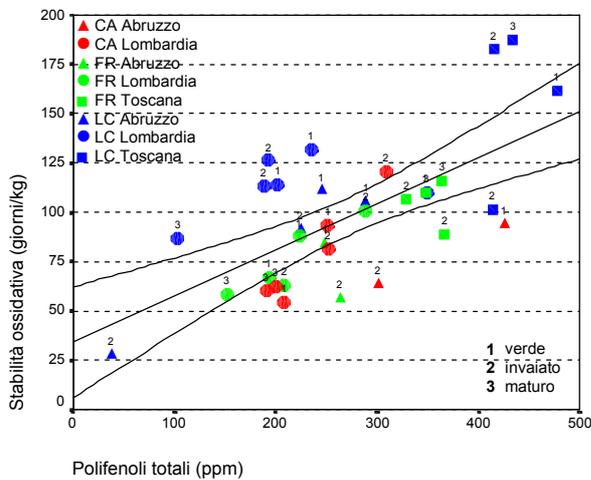


Figura 40 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed i polifenoli e tocoferoli totali:

$$Ra=-19,2+0,26*Pf+0,20*To \quad (r=0,850 \text{ e } r^2=0,722)$$

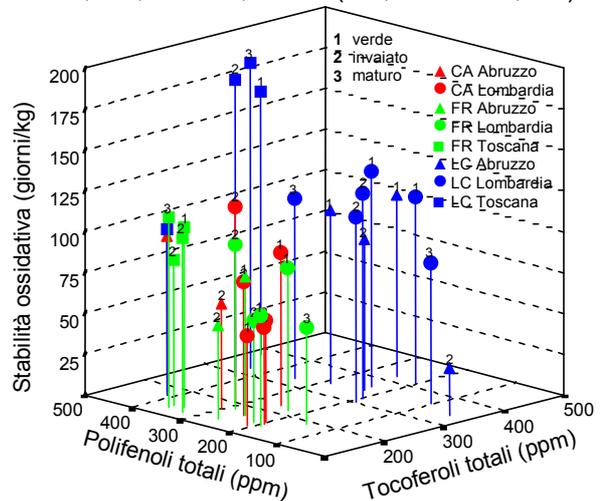


Figura 41 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed il contenuto in tocoferoli totali:

$$Ra=58,8+0,16*To \quad (r=0,446 \text{ e } r^2=0,199);$$

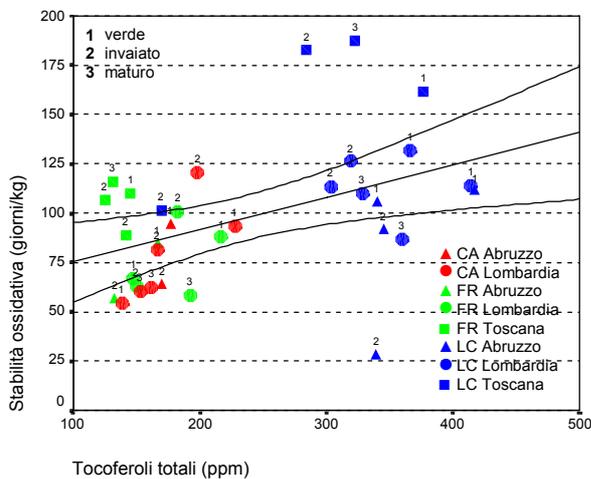
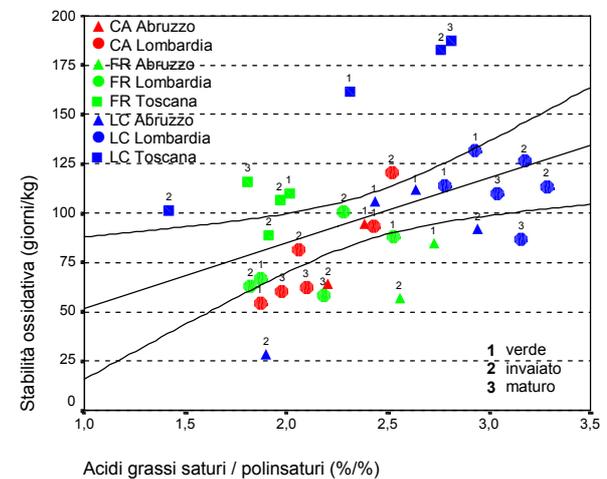


Figura 42 – Correlazione tra la stabilità ossidativa ed il rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi:

$$Ra=19,12+32,9*S/P \quad (r=0,439 \text{ e } r^2=0,193).$$



4.5.10 – Analisi sensoriale

Tabella 81 – Note sensoriali: punteggi normalizzati per cultivar, regione e stadio di maturazioni (U.A.).

VARIABILE	CASALIVA					
	Regione	Abruzzo		Lombardia		
	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo
Erba		12,44	12,44	8,15	8,76	7,91
Foglia		10,70	7,67	8,76	9,17	8,05
Fruttato		6,15	9,80	10,23	9,12	8,05
Fiori		7,33	9,04	8,28	7,23	9,40
Banana		8,57	7,17	9,76	9,76	8,86
Pomodoro		6,89	9,51	8,50	8,78	8,95
Carciofo		7,31	7,31	9,59	8,46	8,31
Mela		7,39	7,39	7,31	8,06	7,74
Burro		7,31	7,31	7,74	7,38	8,02
Noce		7,03	7,03	9,40	9,72	10,25
Fieno		9,42	9,99	7,31	7,33	10,38
Amaro		8,41	5,03	7,58	8,18	7,41
Dolce		6,79	6,79	9,34	9,36	9,62
Piccante		9,03	6,71	8,44	6,85	9,26
Astringente		9,90	6,50	7,20	7,20	9,03
Gradimento		8,87	20,10	22,09	25,91	17,39

VARIABILE	FRANTOIO								
	Regione	Abruzzo		Lombardia		Toscana			
	Stadio di maturazione	verde	invaiaio	verde	invaiaio	matturo	verde	invaiaio	matturo
Erba		7,26	8,41	8,12	9,72	7,65	7,76	8,87	11,56
Foglia		8,71	6,63	8,49	7,87	7,33	10,58	7,47	9,03
Fruttato		5,62	10,60	4,71	10,37	10,32	8,07	9,59	14,18
Fiori		8,56	9,34	7,79	7,93	7,14	10,48	7,64	7,33
Banana		7,17	7,17	8,73	10,30	7,24	7,17	7,32	7,17
Pomodoro		8,65	7,66	10,30	7,79	6,62	6,89	7,50	9,64
Carciofo		7,31	7,31	8,86	7,31	10,17	7,31	9,29	7,31
Mela		8,89	7,39	7,31	8,14	11,79	7,39	8,39	9,21
Burro		8,93	7,31	6,98	9,61	8,46	7,31	7,76	7,31
Noce		8,26	7,03	7,13	8,42	9,29	10,02	6,71	7,03
Fieno		11,43	6,87	7,74	7,10	7,77	6,87	7,50	6,87
Amaro		8,48	5,75	5,66	8,95	5,74	11,33	8,70	7,46
Dolce		6,79	8,76	7,62	8,45	8,99	6,79	7,93	6,79
Piccante		7,54	7,51	6,85	8,22	7,85	8,66	8,74	8,76
Astringente		7,91	7,77	7,20	7,20	7,89	8,38	7,88	6,50
Gradimento		11,33	24,65	11,68	18,36	23,66	6,77	19,34	24,22

VARIABILE	LECCINO								
	Abruzzo		Lombardia			Toscana			
	Regione	Stadio di maturazione		verde	invaiaio	maturo	verde	invaiaio	maturo
Erba	7,26	5,19	7,87	8,55	5,53	3,94	9,36	7,69	
Foglia	8,80	6,48	10,19	8,22	5,72	9,48	6,84	9,55	
Fruttato	7,70	6,72	8,99	8,22	6,23	3,54	5,52	3,66	
Fiori	8,25	9,34	7,72	7,79	9,81	7,33	8,72	7,33	
Banana	8,15	6,89	10,36	7,29	7,83	7,17	7,61	7,17	
Pomodoro	8,08	6,75	7,15	9,06	8,64	6,89	9,89	6,89	
Carciofo	7,39	7,45	9,14	9,29	8,02	7,31	6,93	8,74	
Mela	7,73	8,24	7,91	7,24	8,50	10,17	9,97	7,39	
Burro	8,61	6,98	7,84	10,07	9,57	7,31	8,68	9,32	
Noce	7,52	6,71	7,68	9,30	9,04	12,45	7,88	7,03	
Fieno	8,80	7,22	7,45	8,99	11,88	6,87	6,98	10,07	
Amaro	10,15	4,77	8,71	7,32	6,62	15,08	10,89	11,38	
Dolce	7,17	9,13	6,16	9,20	9,84	6,79	7,27	9,92	
Piccante	7,50	5,23	7,49	8,40	8,46	7,65	9,59	9,85	
Astringente	8,20	7,46	7,20	8,33	7,69	11,68	10,10	12,31	
Gradimento	13,07	8,22	16,71	15,05	13,62	0,45	13,26	14,92	

La composizione in note sensoriali è indicata nella tabella 81, i valori sono espressi in unità arbitrarie (U.A.) normalizzando i dati delle schede di degustazione degli assaggiatori.

La cultivar Casaliva è caratterizzata, in Abruzzo, da forti sensazioni in erba e da basse note in fruttato, banana, carciofo, noce, dolce e nel gradimento complessivo; mentre in Lombardia, da una bassa sensazione in erba, e da alte note in fruttato, banana, carciofo, noce, dolce e nel gradimento.

La varietà Frantoio si distingue in Abruzzo per i bassi valori in erba e foglia, e per l'alto gradimento; in Lombardia per valori bassi in fruttato, fiori, amaro e piccante, ed alti in banana e dolce; ed in Toscana per valori alti in erba, foglia, fruttato, fiori, amaro e piccante, e nel basso gradimento.

L'accessione Leccino, infine, si differenzia in Abruzzo per bassi valori in banana, noce, amaro e piccante; in Lombardia per alti valori in fruttato, fiori, banana, carciofo, fieno e nel gradimento totale, e bassi in mela ed astringenza; in Toscana per bassi valori in fruttato, fiori, carciofo, fieno e nel gradimento totale, ed alti in mela, noce, amaro, piccante ed astringenza.

Lo stadio di maturazione "verde" è caratterizzato principalmente dalle note di erba (funzione 1), e di fruttato e fiori (funzione 2), che sono in grado di separare Casaliva della Lombardia da quella abruzzese, Frantoio toscano ed abruzzese da quello lombardo, e Leccino abruzzese e lombardo da quello toscano (tabelle 82 e 83, e figura 43).

Lo stadio di maturazione "invaiaio" è definito dalle note di fruttato, fiori e banana (funzione 1), e dalle sensazioni di foglia, fruttato e pomodoro (funzione 2), che insieme separano Frantoio della Toscana da quello lombardo e da quello abruzzese, Casaliva della Lombardia da quella abruzzese, e Leccino dell'Abruzzo da quello toscano e lombardo.

Lo stadio di maturazione “maturo” è differenziato dalla sensazione di erba (funzione 1), capace di separare Leccino toscano da quello lombardo, e Casaliva e Frantoio lombardo da quello toscano.

Nell’insieme delle epoche di maturazione, la separazione dei campioni avviene mediante le sensazioni di erba, fiori, banana, pomodoro, fieno, dolce ed astringenza (funzione 1), oltre che di noce ed amaro (funzione 2); nel loro insieme dividono la cultivar Casaliva dell’Abruzzo da quella lombarda, Leccino della Lombardia da quello abruzzese e da quello toscano, mentre Frantoio non risulta ben separato nelle tre regioni.

Tabella 82 – Note sensoriali: riepilogo delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

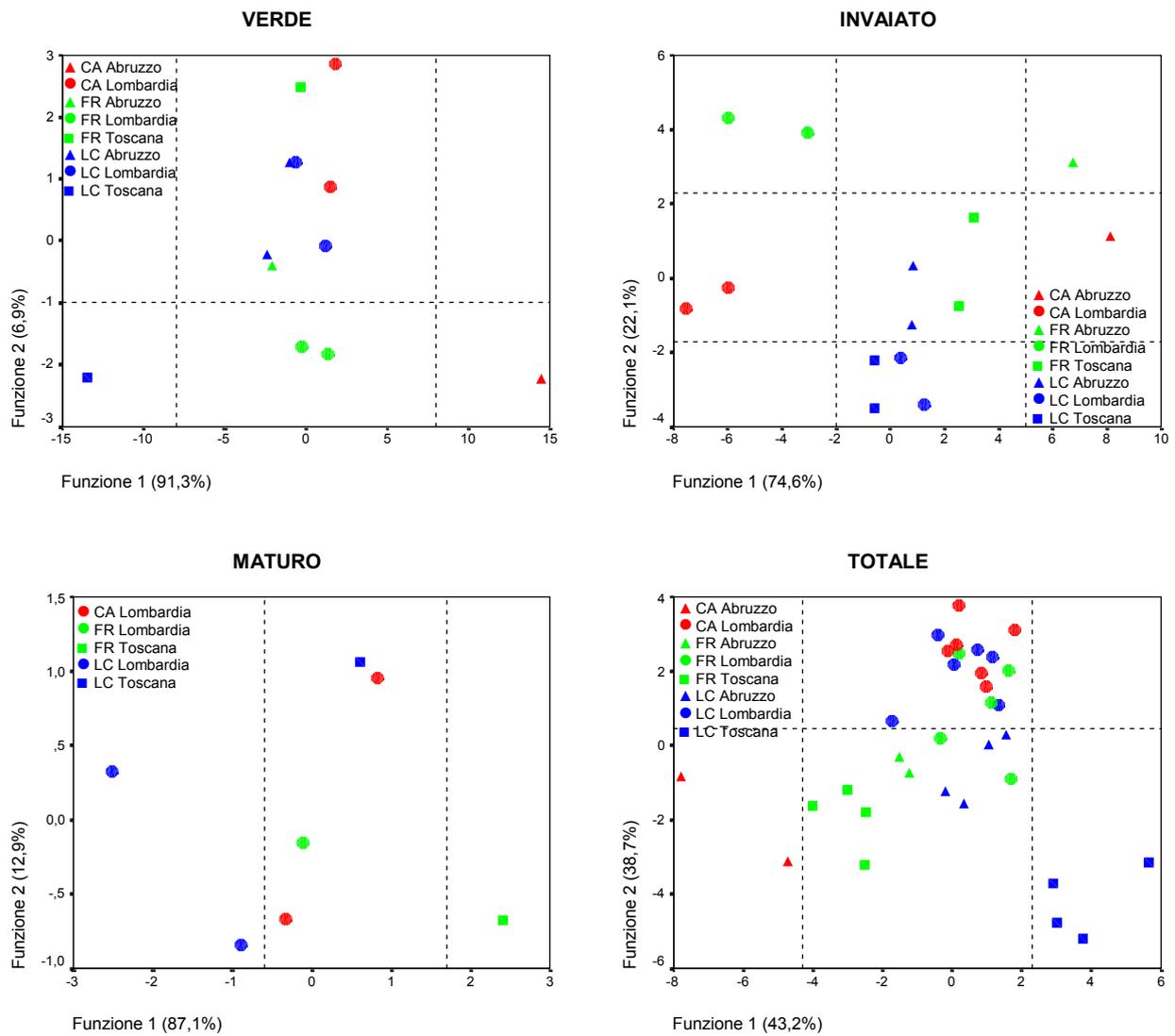
Modello	Funzione	Autovalore	% varianza	% cumulata	Correlazione	λ Wilks	χ^2	df	Sig.
VERDE	1	101,7	91,3	91,3	0,995	0,000	40,0	28	0,066
	2	7,670	6,9	98,2	0,941	0,034	16,9	18	0,532
	3	1,879	1,7	99,8	0,808	0,297	6,1	10	0,809
INVAIATO	1	43,76	74,6	74,6	0,989	0,000	46,6	42	0,290
	2	12,97	22,1	96,8	0,964	0,019	23,8	30	0,783
	3	1,37	2,3	99,1	0,760	0,266	7,9	20	0,992
MATURO	1	6,044	87,1	87,1	0,926	0,075	6,5	8	0,593
	2	0,898	12,9	100,0	0,688	0,527	1,6	3	0,659
TOTALE	1	7,393	43,2	43,2	0,939	0,002	130,1	105	0,049
	2	6,629	38,7	81,9	0,932	0,015	86,5	84	0,406
	3	1,525	8,9	90,9	0,777	0,112	44,8	65	0,974

Tabella 83 – Note sensoriali: coefficienti delle funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.

VARIABILI	VERDE			VARIABILI	INVAIATO		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Erba	1,183	-0,064	0,050	Foglia	-1,284	-2,293	0,258
Foglia	-0,575	-0,241	-0,352	Fruttato	2,974	2,091	-0,293
Fruttato	0,305	0,928	-0,438	Fiori	2,201	1,491	-0,411
Fiori	0,001	0,760	0,839	Banana	-3,171	1,088	-0,080
				Pomodoro	-0,208	-2,123	-0,129

VARIABILI	MATURO			VARIABILI	TOTALE		
	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3		Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Erba	0,809	-0,599	-	Erba	-1,975	-0,891	1,079
Foglia	0,500	0,874	-	Fiori	-1,074	-0,481	-0,413
				Banana	1,071	0,724	0,546
				Pomodoro	1,796	0,401	-0,056
				Noce	-0,361	1,084	0,568
				Fieno	-1,085	0,071	0,380
				Amaro	-0,185	-1,336	-0,664
				Dolce	1,186	-0,055	-0,284
				Astringente	1,156	-0,157	0,651

Figura 43 – Note sensoriali: punteggi delle prime funzioni discriminanti per gli stadi di maturazioni.



5 – CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

5.1 – GENOTIPO E QUALITA'

L'influenza del genotipo è risultata il fattore più importante nel definire la qualità dell'olio di oliva.

Dalle analisi chemiometriche degli oli monovarietalì è stato possibile ottenere alcuni raggruppamenti in base ad affinità varietali, comportamento confermato anche dall'analisi dei composti volatili, usati per la caratterizzazione aromatica negli oli vergini di oliva commerciali.

5.1.1 – Caratterizzazione chemiometrica

Dall'analisi degli oli valutati in base alla caratterizzazione chemiometrica sono emersi gruppi di cultivar affini, in cui alcune variabili chemiometriche restano relativamente costanti negli anni, mentre altre cultivar sono risultate bene caratterizzate e separate tra di loro, mostrando un alto livello di diversità e specificità.

Il primo gruppo di affinità comprende le cultivar Casaliva 1, Casaliva 2, Frantoio e Raza. La loro affinità è definita dalla composizione trigliceridica (poco POL_n e molto E_cOO), dal basso contenuto in alcoli alifatici (docosanolo, tricosanolo, tetracosanolo e pentacosanolo), dal basso valore di butirrospermolo, dal profilo medio in polifenoli, ed dai bassi contenuti in tocoferoli (α , β e γ tocoferolo).

Il secondo gruppo di affinità è composto da Less e Rossanello. La loro affinità è dovuta al profilo medio in acidi grassi, alla composizione in trigliceridi (poco POL_n e molto E_cOO), al basso contenuto in alcoli alifatici (docosanolo, tricosanolo, tetracosanolo e pentacosanolo), al basso contenuto in butirrospermolo, al basso contenuto in tocoferoli, ed al profilo medio dei composti volatili.

Il terzo gruppo di affinità è costituito da Gargnà e Leccino. La loro affinità è determinata dall'alto contenuto in acido palmitico, dalla composizione trigliceridica (alto POO+SOL e PPO+PSL), dal profilo medio sterolico, dal profilo medio in polifenoli, dal profilo medio basso in pigmenti, e dal profilo medio in composti volatili.

Dalla matrice di similarità, inoltre, sono emerse altre affinità varietali tra Less con Casaliva 1 e Casaliva 2, e tra Rossanello con Casaliva 1 e Casaliva 2, in base alla composizione in acidi grassi, trigliceridi, alcoli alifatici e triterpenici, tocoferoli e composti volatili; tra Raza e Leccino, determinata dalla composizione acidica, alcolica, sterolica, polifenolica ed aromatica; e tra Rossanello e Raza, definita dal contenuto in trigliceridi, alcoli, steroli, tocoferoli e composti volatili.

Un'ulteriore osservazione può essere riportata a riguardo delle cultivar minori locali, quali Baia, Grignano, Mitria e Regina. Esse mostrano un profilo chemiometrico molto differenziato e distinto rispetto alla cultivar principale locale Casaliva. In particolare, la cultivar Mitria si è evidenziata per il suo alto contenuto in tocoferoli, carotenoidi e clorofille, determinando queste ultime un'intensa colorazione verde dell'olio.

La stabilità ossidativa è risultata correlata principalmente al contenuto in polifenoli totali e secondariamente al rapporto tra acidi grassi saturi su polinsaturi, mentre non risulta influente il contenuto in tocoferoli. Si mettono in evidenza, al riguardo, quattro cultivar per la loro elevata stabilità ossidativa: Leccino, Miniol, Regina e Rossanello. Questo comportamento può essere spiegato in base all'elevato contenuto in polifenoli (Miniol e Rossanello), o all'alto rapporto tra acidi grassi saturi su polinsaturi (Leccino e Regina).

Dai risultati dell'analisi sensoriale si è notato che le accessioni si distinguono anche per tale carattere: Baia, Maurino e Miniol presentano un profilo sensoriale differenziato, mentre le altre cultivar sono raccolte in gruppi, aventi ognuno un profilo caratteristico.

5.1.2 – Caratterizzazione enzimatica

I dati dello studio dell'attività enzimatica (lipossigenasi ed idroperossido liasi) sono risultati molto importanti dal punto di vista della produzione di "olio di qualità", in quanto possono indicare l'ottimale periodo per la raccolta delle olive, al fine di ottenere oli più ricchi in sostanze aromatiche, in conseguenza all'aumento dell'attività enzimatica nei frutti. Si è osservato, infatti, che nella fase finale dell'invasatura (seconda e terza decade di novembre) le attività enzimatiche nelle drupe aumentano in tutte le cultivar in entrambi gli anni di sperimentazione, da cui consegue che negli oli vengono accumulati più composti volatili C₆, (esanale, *cis*-3-esenale, *trans*-2-esenale, esanolo, *cis*-3-esenolo, *trans*-2-esenolo, e loro esteri), i quali incrementano la percezione sensoriale di "note verdi" e di "fruttato", rendendoli più graditi al consumatore.

I risultati ottenuti possono ritenersi introduttivi al fine di completare le conoscenze dell'influenza enzimatica sulla qualità dell'olio. Studi ulteriori e più approfonditi, infatti, potrebbero riguardare la correlazione tra le attività enzimatiche ed i composti volatili in diverse condizioni ambientali e pedo-climatiche.

Tali risultati, inoltre, lasciano intravedere la possibilità per la messa a punto di un metodo in grado di valutare il livello della componente enzimatica (responsabile della produzione dei composti volatili) delle drupe, che possa essere utilizzato come indice di raccolta.

Dall'analisi dei dati enzimatici è emerso, infine, che nella cultivar Casaliva le attività della lipossigenasi e dell'idroperossido liasi sono quasi sempre superiori a quelle della varietà Frantoio, mentre in Leccino mostrano andamenti diversificati nei 2 anni. La differenziazione enzimatica tra Casaliva e Frantoio è risultata particolarmente interessante, traendo riscontro anche in un differente profilo aromatico. Viceversa, dal confronto dei profili chemiometrici complessivi, i due oli risultano nello stesso gruppo di affinità, compresa l'analisi sensoriale.

5.1.3 – Caratterizzazione aromatica

La SPME è risultata una tecnica utile per analizzare i composti volatili negli oli di oliva. I profili degli aromi assorbiti sulla fibra PDMS consentono estrazioni veloci e riproducibili. L'analisi accoppiata SPME/GC potrebbe probabilmente, se ulteriormente sviluppata, fornire un metodo per facilitare l'identificazione degli oli di cultivar simili.

I risultati dimostrano che il profilo di alcuni oli australiani è differente da quello degli oli europei.

Sono state osservate, inoltre, differenze notevoli nel componente volatile maggiore (*trans*-2-esenale) che in tutti gli oli europei è il composto aromatico più rappresentativo, mentre lo è solo per una parte degli oli australiani.

L'origine varietale ha prodotto le principali dissimilarità sul profilo. L'analisi dei profili aromatici, infatti, ha fornito un raggruppamento distinto degli oli della cultivar Corregiola rispetto a quelli della cultivar Manzanillo, ed una separazione di questi dagli oli plurivarietal, consentendo anche di separare gli oli di origine sconosciuta. Si sono osservate, inoltre, differenze nel raggruppamento degli oli in base alle epoche di raccolta, anche se queste erano troppo casuali per permettere delle chiare conclusioni a riguardo.

Occorre tener presente che le condizioni di lavorazione delle olive (tempi e temperatura di gramolazione) possono influenzare il profilo aromatico: ad esempio, un aumento di temperatura ed una diminuzione del tempo di gramolazione portano ad una riduzione nella quantità dei composti volatili.

5.2 – AMBIENTE E QUALITA'

L'influenza ambientale (pedo-climatica) è risultata un fattore importante nel definire diversi aspetti qualitativi dell'olio vergine di oliva, anche se interviene in misura minore rispetto al fattore genetico (cultivar).

La variabilità dei meso-climi (localizzazione degli oliveti) e delle condizioni pedologiche nell'area gardesana non sono risultate significative nel definire l'origine aziendale degli oli, per cui le differenze tra le cultivar o le condizioni meteorologiche fra gli anni emergono in modo più significativo. Viceversa, le influenze ambientali su scala regionale, con macro-climi e profili pedologici molto differenti, sono risultate utili nella possibile caratterizzazione degli oli in funzione dell'origine geografica (cultivar-regione).

5.2.1 – Influenze nell'area gardesana

Dall'analisi degli oli prodotti da alcune cultivar in diverse aziende agricole dell'area gardesana in quattro anni di indagine, è emerso che le differenze tra le cultivar sono risultate quasi sempre significative per la maggior parte delle variabili chemiometriche, poco significative le differenze tra gli anni, e solo raramente per la localizzazione degli oliveti (siti). Le interazioni di primo grado tra cultivar, anni e siti non sono risultate quasi mai significativamente diverse.

In particolare, le cultivar Casaliva e Frantoio non si sono mai differenziate tra di loro, mentre sono risultate sempre distinte da Leccino e Pendolino. Le principali variabili chemiometriche risultate particolarmente utili per la caratterizzazione varietale sono state: palmitico, eptadecenoico, linoleico, linolenico, eicosenoico e behenico, per gli acidi grassi; OLL, OOL_n+P_oOL+PLL, POL+P_oPO, PPL, OOO e PPO+PSL, per i trigliceridi; tricosanolo, tetracosanolo, esacosanolo ed ottacosanolo, per gli alcoli alifatici; β-amirina, α-amirina, 24-metilencicloartanolo e citrostadienolo, per gli alcoli triterpenici; stigmasterolo, sitostanolo, Δ⁵,24-stigmastadienolo, eritrodioleolo ed uvaolo, per gli steroli; i polifenoli totali; i tocoferoli α e γ; 2-metilbutanale, 3-metilbutanale ed 1-penten-3-olo, per i composti volatili.

I quattro anni di indagine non sono risultati sempre differenziati tra di loro e solo il 1998 è risultato particolarmente distinto. Nell'insieme delle variabili chemiometriche omogenee, di solito, solo alcuni gruppi sono risultati significativi, anche se ciò non ha consentito di differenziare gli anni in modo chiaro; ha fatto eccezione la composizione aromatica, che ha invece consentito una buona differenziazione tra le annate, forse ad indicare che i composti volatili sono particolarmente influenzati dalle condizioni meteorologiche. Le variabili chemiometriche risultate più importanti per la caratterizzazione degli anni sono state: oleico, eicosenoico e lignocericico, per gli acidi grassi; PPL ed AOO, per i trigliceridi; esacosanolo ed eptacosanolo, per gli alcoli alifatici; β-amirina, butirrospermolo, cicloartenolo e 24-metilencicloartanolo, per gli alcoli triterpenici; brassicasterolo e β-sitosterolo, per gli steroli; idrossitirosolo e polifenoli totali; β tocoferolo; 3-metilbutanale, etanolo, esanale, 2-metil-1-propanolo, *trans*-2-pentenale e 3-metil-1-butanolo, per i composti volatili.

Come già evidenziato a proposito del confronto varietale, nell'insieme delle cultivar il rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi ed il contenuto totale in polifenoli sono risultati significativi al fine di definire la stabilità ossidativa degli oli. Considerando le cultivar separatamente, invece, la stabilità ossidativa è risultata significativamente influenzata dai polifenoli totali e dal rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi in Casaliva, solo dai tocoferoli totali in Frantoio e Pendolino, ed in Leccino solo dai polifenoli totali.

L'analisi delle note sensoriali non ha dato risultati utili per distinguere le cultivar, mentre riguardo agli anni le note sensoriali di erba, fruttato e dolce, sono state in grado di caratterizzare il 2000 rispetto agli altri anni.

5.2.2 – Influenze regionali in Italia

Mentre dall'analisi degli oli dell'area gardesana non è stato possibile evidenziare possibili effetti mesoclimatici (tra azienda ed azienda), il confronto degli oli campionati nelle tre regioni ha consentito di riscontrare interessanti influenze macroclimatiche. Considerando tutti i campioni di olio (indistintamente dall'epoca di maturazione) si è riusciti ad ottenere dati utili al fine di differenziare sia le cultivar, sia la regione di produzione, anche se le cultivar Casaliva e Frantoio risultano indistinte, ma separate da Leccino.

Quando gli oli sono considerati in base ai tre stadi di maturazione, si riesce quasi sempre a separare in modo significativo sia le tre cultivar (Casaliva, Frantoio e Leccino), sia le tre regioni (Abruzzo, Lombardia e Toscana). La separazione migliore si è ottenuta per gli oli prodotti da olive invaiate, mentre per gli stadi di maturazione "verde" e "maturo" non sempre la distinzione cultivar-regione è apparsa significativa.

Riguardo alle variabili chemiometriche più interessanti ai fini della caratterizzazione, gli acidi grassi oleico, linoleico ed eicosenoico hanno caratterizzato Leccino della Lombardia rispetto a quello toscano ed abruzzese, e Casaliva e Frantoio della Lombardia rispetto a quelli dell'Abruzzo e della Toscana.

I trigliceridi POL+P_oPO e OOO hanno separato Casaliva della Lombardia e dell'Abruzzo con Frantoio lombardo da quello toscano ed abruzzese, e distinto Leccino delle tre regioni.

Gli alcoli alifatici tricosanolo, esacosanolo ed eptacosanolo hanno differenziato Leccino toscano dalle altre regioni, e Casaliva e Frantoio lombardi ed abruzzesei da quello toscano.

Gli alcoli triterpenici dammaradienolo, butirrospermolo ed α -amirina hanno separato le cultivar Casaliva e Frantoio, distinte per regione, da Leccino, la quale risulta invece indipendente dall'origine.

Gli steroli β -sitosterolo e Δ 5-avenasterolo hanno distinto l'origine delle cultivar Casaliva e Frantoio (ma non l'una dall'altra) rispetto alla cultivar Leccino (distinta tra le tre regioni).

L'idrossitirosolo, il vanillico, l' α tocoferolo e le clorofille totali hanno differenziato principalmente Casaliva e Frantoio da Leccino, e solo secondariamente rispetto alla provenienza.

I composti volatili 2-metilbutanale, 3-metilbutanale, 1-pentanololo, *trans*-2-esenolo ed 1-ottanololo hanno separato Casaliva e Frantoio della Lombardia da quelli abruzzesi e da quello toscano, e Leccino abruzzese da quello toscano e lombardo.

La stabilità ossidativa è risultata correlata al contenuto in polifenoli e tocoferoli totali ed al rapporto tra acidi grassi saturi su polinsaturi. In generale, a parità di contenuto in polifenoli totali, la cultivar Leccino mostra una stabilità ossidativa più alta rispetto alle cultivar Casaliva e Frantoio, dovuta principalmente all'alto contenuto in tocoferoli totali ed in misura minore all'alto rapporto tra acidi grassi saturi su polinsaturi. Gli stadi di maturazione non mostrano una differenza significativa rispetto alla stabilità ossidativa, mentre l'origine regionale sembra importante: la Toscana mostra, infatti, valori di stabilità ossidativa quasi sempre più alti rispetto alla Lombardia e all'Abruzzo.

L'analisi del profilo sensoriale, infine, non ha separato le tre cultivar in Lombardia, mentre nelle altre regioni il Leccino è risultato differenziato rispetto a Casaliva e Frantoio dalle note di erba, pomodoro, noce, ed amaro.

Il complesso dei dati emersi da questo lavoro di tesi (analisi pluriennali condotte su oli monovarietal di cultivar ben identificate e caratterizzate ed in ambienti differenziati dal punto di vista pedo-climatico) ha consentito di mettere in luce interessanti considerazioni circa l'influenza delle diverse variabili (genetiche, ambientali e relative interazioni) sulla composizione chimico-fisica degli oli, oltre che sul loro valore globale.

Ovviamente tali risultati non devono portare ad un'automatica generalizzazione, ma possono offrire spunto per ulteriori approfondimenti (e possibili conferme) in altre situazioni ambientali e con cultivar diverse.

6 – BIBLIOGRAFIA

- AAVV (1998). I controlli di qualità dell'olio. Atti del IV convegno 'Lab 2000 Food' (Como, 15 giugno 1998). *Ed. Morgan*.
- Adams R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation – Carol Stream, Illinois USA*.
- Agar I.T., Hesspierce B., Sourour M.M. and Kader A.A. (1998). Quality of fruit and oil of black-ripe olives is influenced by cultivar and storage period. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3415-3421.
- Ajana H., El Antari A. and Hafidi A. (1998). Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar. *Grasas y Aceites* **49**: 405-410.
- Aluigi G., Bacchiocca M. e Ninfali P. (1999). Valutazione del potere antiossidante totale dell'olio di oliva. *Olivo & Olio* **6**: 36-39
- Amelotti G. (1990). Sostanze grasse alimentari. *CLESAV Milano*.
- Amiot M.J., Fleuriet A. and Macheix J.J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 823-826.
- Andrikopoulos N.K., Giannakis I.G. and Tzamtzis V. (2001). Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. *J. Chromatographic Science* **36**: 137-145.
- Angerosa F. (1998). La qualità organolettica degli oli vergini di oliva. *Rivista di Frutticoltura* **7/8**: 47-50.
- Angerosa F. and Basti C. (2001). Olive oil volatile compounds from the lipoxygenase pathway in relation to fruit ripeness. *Ital. J. Food Sci.* **13**: 421-428.
- Angerosa F. e Di Giacinto L. (1995). Caratteristiche di qualità dell'olio di oliva vergine in relazione ai metodi di frangitura. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 1-4.
- Angerosa F., Basti C. and Vito R. (1999). Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 836-839.
- Angerosa F., Camera L., D'Alessandro N. and Mellerio G. (1998). Characterization of Seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 648-653.
- Angerosa F., D'Alessandro N., Corana F. and Mellerio G. (1996c). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatography* **736**: 195-203.
- Angerosa F., D'Alessandro N., Konstantinou P. and Di Giacinto L. (1995). GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1802-1807.
- Angerosa F., Di Giacinto L. and D'Alessandro N. (1997). Quantitation of some flavor components responsible for the "green" attributes in virgin olive oils. *J. High Resol. Chromatogr.* **20**: 507-510.
- Angerosa F., Di Giacinto L., Basti C. e Serraiocco A. (1996a). Influenza della variabile "ambiente" sulla composizione degli oli vergini di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **73**: 461:467.
- Angerosa F., Di Giacinto L., Vito R. and Cumitini S. (1996b). Sensory evaluation of virgin olive oils by artificial neural network processing of dynamic head-space gas chromatographic data. *J. Sci. Food Agric.* **72**: 323-328.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. and Vito R. (2000a). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry* **68**: 283-287.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. and Vito R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry* **72**: 19-28.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R. and Serraiocco A. (2000b). Virgin olive oil differentiation in relation to extraction methodologies. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 2190-2195.
- Antolini P. (1997). Il grande manuale dell'ulivo e dell'olio. *Editoriale Giorgio Mondatori*.
- Antolovich M., Prenzler P., Robards K. and Ryan D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* **125**: 989-1009.
- Aparicio R. and Aparicio-Ruiz R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatography* **881**: 93-104.
- Aparicio R. and Morales M.T. (1995). Sensory Wheels: a Statistical Technique for Comparing QDA Panels – Application to Virgin Olive Oil. *J. Sci. Food Agric.* **67**: 247-257.

- Aparicio R., Calvente J.J. and Morales M.T. (1996b). Sensory authentication of European extra virgin olive oil varieties by mathematical procedures. *J. Sci. Food Agric.* **72**: 435-447.
- Aparicio R., Morales M.T. and Alonso M.V. (1996a). Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by sensory wheel. *JAOCs* **73**: 1253-1263.
- Aparicio R., Morales M.T. and Alonso M.V. (1997). Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers' attitudes. *J. Agri. Food Chem.* **45**: 1076-1083.
- Aparicio R., Roda L., Albi M.A. and Gutiérrez F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4150-4155.
- Arrigo L. e Rondinone R. (1995). I micronutrienti "eu-ossidanti" nell'olio di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 11-14.
- Bacchiocca M., Aluigi G., Servili M., Begliomini A.L., Montedoro G.F. e Ninfali P. (2001). Convalida del metodo ORAC nella previsione della stabilità dell'olio extra vergine di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 151-155.
- Baldini A., Caselli S., Marranci M. e Tracchi S. (1996). Conservazione dell'olio: evoluzione di parametri analitici e sensoriali in oli toscani monovarietali. Atti del convegno "L'Olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della coltura e della ricerca", Rende (CS - Italia), 26-28 gennaio 1995. Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura, Cosenza - Italy: 677-680.
- Baldioli M., Servili M., Perretti G. and Montedoro G.F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAOCs* **73**: 1589-1593.
- Bassi D., Pretolani R. e Marca F. (2002b). Olio di qualità: produzione e commercializzazione dell'olio extra vergine di oliva lombardo. *Regione Lombardia Agricoltura – AIPOL*.
- Bassi D., Tura D., Geuna F., Failla O. and Pedò S. (2002a). Characterization of local olive (*Olea europea* L.) accessions by oil composition, morphological and molecular markers methods. *Acta Horticulturae* **586**: 57-60.
- Ben Miled D.D., Smaoui A., Zarrouk M. and Cherif A. (2000). Do extraction procedures affect olive oil quality and stability? *Biochemical Society Transactions* **28**: 929-933.
- Bentivenga G., D'Auria M., De Luca E., De Bona A. and Mauriello G. (2001). The use of SPME-GC-MS in the analysis of flavor of virgin olive oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 157-162.
- Bergonzi M. (A.A. 2000-2001). Caratterizzazione degli oli di oliva extra vergini della riviera gardesana. *Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari – Università degli Studi di Milano*.
- Bertrand E. (2002). Alimentazione mediterranea: i vantaggi per il sistema cardiovascolare. *Olivae* **90**: 29-31.
- Bianchi E., Bruschi R. e Fabietti F. (1993). Indagini sulla provenienza di oli di oliva del commercio italiano. *Industrie Alimentari* **32**: 632-635.
- Bianchi G. (1995). Il panel test nel campo della valutazione sensoriale. *L'Informatore Agrario* **50**: 63-65.
- Bianchi G. e Giansante L. (2001). Tutela degli oli d'oliva extra vergine dop. *L'Informatore Agrario* **22**: 52-54.
- Bianchi G., Giansante L. e Lazzari M. (1996). Analisi per la tutela di genuinità, origine geografica e varietale degli oli vegetali. *L'Informatore Agrario* **19**: 45-48.
- Bianchi G., Vlahov G. e Di Giovacchino L. (2002). Gli oli vergini di oliva a D.O.P. pugliesi – qualità e composizione. *Istituto Sperimentale per l'Elaiotecnica*.
- Bianco A. and Uccella N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International* **33**: 475-485.
- Bollettino Ufficiale della Regione Lombardia del 23 marzo 1998. Allegato B - Disciplinare di produzione della denominazione di origine controllata dell'olio extra vergine di oliva "Garda".
- Bollettino Ufficiale della Regione Lombardia del 23 marzo 1998. Allegato C - Disciplinare di produzione della denominazione di origine controllata dell'olio extra vergine di oliva "Laghi lombardi".
- Boni D. (A.A. 2001-2002). Caratterizzazione di oli extra vergini di oliva della riviera gardesana: evoluzione degli indici di qualità - freschezza durante la conservazione. *Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari – Università degli Studi di Milano*.
- Bonina F., Muzzalupo I. e Uccella N. (1999). Oleuropeina ed idrossitirosole, biofenoli dell'ulivo, "radical scavenging" protettori cutanei. *Olivo & Olio* **7/8**: 48-53.
- Bortolomeazzi R., De Zan M., Pizzale L. and Conte L. S. (1999). Mass spectrometry characterization of the 5 alpha-, 7 alpha-, and 7 beta-hydroxy derivatives of beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol. *J. Agric. Food Chem.* **47**:3069-3074.

- Botia J.M., Ortuno A., Benavente-Garcia O., Baidez A.G., Frias J., Marcos D. and Del Rio J.A. (2001). Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europea* L. fruits: their influence on olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 355-358.
- C. O. I. Consiglio Oleicolo Internazionale (1996). Enciclopedia Mondiale dell'Olivo. *Agra Editrice*.
- Calafatello A., Pipitone F. e Peri G. (1999). Raccolta meccanica delle olive e qualità dell'olio. *Olivo & Olio* **2**: 28-32.
- Campeol E., Flamini G., Chericoni S., Catalano S. and Cremonini R. (2001). Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5409-5411.
- Camussi A., Möller F., Ottaviano E. e Sari Gorla M. (1995). Metodi statistici per la sperimentazione biologica. *Zanichelli*.
- Canjura F.L. and Schwartz S.J. (1991). Separation of chlorophyll compounds and their polar derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1102-1105.
- Capella P., Fedeli E., Bonaga G. e Lercker G. (1997). Manuale degli oli e dei grassi. *Tecniche Nuove*.
- Capella P., Lercker G. e Conte L.S. (1981). Problemi di conservazione delle sostanze grasse. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 119-124.
- Caponio F., Alloggio V. and Gomes T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry* **64**: 203-209.
- Caponio F., Gomes T. and Pasqualone A. (2001). Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *European Food Research & Technology* **212**: 329-333.
- Caponio F., Pasqualone A., Del Curatolo D., Bilancia M.T. e Lamparelli F. (2000). Influenza dei parametri tecnologici di lavorazione e delle caratteristiche morfo-fisiologiche delle drupe sulla qualità degli oli extra vergini di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **77**: 721-726.
- Carazzolo A., Conte L., Pavan O. e Tonutti P. (1999). Qualità degli oli extra vergini di oliva veneti. *L'Informatore Agrario* **55**: 115-120.
- Castelli F., Muzzalupo I., Saija A., Tomaino A. e Uccella N. (1999). I biofenoli nelle olive e nell'olio per il benessere dell'uomo. *Olivo & Olio* **9**: 48-61.
- Cataldi Lupo M.C., Nicolosi Asmundo C., Campisi S. e Fichera G. (1995). Gli oli vergini d'oliva dell'altopiano ragusano. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 269-272.
- Cert A., Moreda W. and Pèrez-Camino M.C. (2000). Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatography A* **881**: 131-148.
- Chiarulli S. (A.A. 1999-2000). Uso di tecniche chemiometriche e di risonanza magnetica nucleare nell'analisi degli oli extra vergini di oliva del Garda bresciano. *Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari – Università degli Studi di Milano*.
- Cimato A. (1988). La qualità dell'olio vergine di oliva ed i fattori agronomici. *L'Informatore Agrario* **45**: 63-69.
- Cimato A., Baldini A. e Moretti R. (1997). L'olio di oliva: cultivar, ambiente e tecniche agronomiche – Parte 1^a. *Regione Toscana - A.R.S.I.A.*
- Cimato A., Baldini A. e Moretti R. (1999). L'olio di oliva: cultivar, ambiente e tecniche agronomiche – Parte 2^a. *Regione Toscana - A.R.S.I.A.*
- Cinquanta L., Esti M. and Lanotte E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *JAOCS* **74**:1259-1264.
- Cortesi N., Azzolini M. e Rovellini P. (1995a). Dosaggio dei componenti minori polari (CMP) in oli vergini di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 333-337.
- Cortesi N., Azzolini M., Rovellini P. e Fedeli E. (1995b). I componenti minori polari degli oli vergini di oliva: ipotesi di struttura mediante LC-MS. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 241-251.
- Cortesi N., Ponziani A. e Fedeli E. (1981). Caratterizzazione degli oli vergini e raffinati mediante HPLC dei componenti polari. Nota preliminare. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 108-114.
- Cristoferi G. (2001), La qualità dell'olio extra vergine di oliva dei colli riminesi: la cultivar Correggiolo. *Istituto di Ecofisiologia delle piante Arboree da frutto – C.N.R. di Bologna*.
- D'Andria R., Morelli G., Martuccio G., Fontanazza G. e Patumi M. (1996). Valutazione della produzione e della qualità dell'olivo allevate con diversi regimi idrici. *Italus Hortus* **3**: 23-31.
- Damiani P., Burini G. and Daddi P. (1983). Chemometrics in food research: relationships between triglyceride groups and fatty acid composition in olive oil. *JAOCS* **60**: 539-543.

- De Hoffmann E., Charette J. and Stroobant V. (1996). Mass Spectrometry, principles and applications. *John Wiley & Sons – Masson*.
- De Leonardis A., Macciola V. and Defelice M. (1998). Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography. *Ital. J. Food Sci.* **10**: 75-80.
- Deidda P., Nieddu G., Spano D., Bandino G., Orru V., Solinas M. and Serraiocco A. (1994). Olive oil quality in relation to environmental conditions. *Acta Horticulturae* **356**: 354-357.
- Del Signore A. (1999). Factors affecting the differentiation of virgin olive oils determined by multivariate statistical analysis of volatile compounds. *Journal of Commodity Science* **38**: 79-103.
- Di Giovacchino L. (1997). From olive harvesting to virgin olive oil production. *Oleagineux Corps Gras Lipides* **4**: 359-361.
- Di Giovacchino L. e Costantini N. (1991). L'estrazione dell'olio dalle olive mediante doppia lavorazione. Nota II: risultati ottenuti con la doppia centrifugazione. *Rivista italiana delle sostanze grasse* **68**: 519-527.
- Di Giovacchino L. e Serraiocco A. (1995). Influenza dei sistemi di lavorazione delle olive sulla composizione dello spazio di testa degli oli. *Rivista italiana delle sostanze Grasse* **72**: 443-450.
- Di Giovacchino L., Costantini N. e Di Febo M. (1994). La centrifugazione delle paste di olive senza acqua di diluizione. *Rivista italiana delle sostanze grasse* **71**: 555-560.
- Di Giovacchino L., Costantini N., Serraiocco A., Surricchio G. and Basti C. (2001). Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European Journal of Lipid Science & Technology* **103**: 279-285.
- Drava G., Forina M., Lanteri S. and Lupoli M. (1994). development of the chemical model of a typical food product: olive oil from an Italian region (Basilicata). *J. Sci. Food Agric.* **65**: 21-30.
- Dugo G., Lo Curto S., Alfa M., Di Bella G., Lo Turco V., Mavrogeni E., Saitta M., Salvo F., Pizzimenti G. e Maisano R. (2000). Caratterizzazione di oli di oliva vergini siciliani – Nota V: la cv. Nocellara del Belice *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **77**: 803-833.
- El-Antari A., Hilal A., Boulouha B. and El-Moudni A. (2000). Influence of variety, environment and cultural techniques on the characteristics of olive fruits and the chemical composition of extra virgin olive oil in Morocco. *Olivae* **80**: 29-36.
- Emanuele M.C., Mannina L., Patumi M. e Segre A.L. (1998). L'olio di oliva e la risonanza magnetica nucleare protonica ad alto campo. *Olivo & Olio* **2/3**:53-57.
- Esti M., Cinquanta L., Carrone A., Trivisonno M.C., La Notte E. e Gambacorta G. (1996a). Composti antiossidanti e parametri qualitativi di oli vergini di oliva prodotti in Molise. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **73**: 147-150.
- Esti M., Gambacorta G., Carrone A. e Trivisonno M.C. (1996b). Caratteristiche qualitative e compositive di oli vergini di oliva prodotti in Molise. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **73**: 101-106.
- Failla O., Tura D. and Bassi D. (2002). Genotype – environment – year interaction on oil antioxidants in an olive district of northern Italy. *Acta Horticulturae* **586**: 171-174.
- Fakourelis N., Lee E.C. and Min D.B. (1987). Effects of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oil. *J. Food Science* **52**: 234-235.
- Farinelli D., Boco M. e Tombesi A. (2000). Evoluzione della sintesi dell'olio in alcune varietà di olivo. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **62**: 81-87.
- Fauconnier M.L. and Marlier M. (1997). Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review. *Grasas y Aceites* **48**: 30-37.
- Fedeli E. e Cortesi N. (1993). Qualità, provenienza e tecnologia degli oli di oliva vergini. *Rivista italiana delle sostanze Grasse* **70**: 419-426.
- Finotti E., Beye., Nardo N., Quaglia G.B., Milin C and Giacometti J. (2001). Physico-chemical characteristics of olives and olive oil from two mono-cultivars during various ripening phases. *Nahrung* **45**: 350-352.
- Fontanazza G., Patumi M., Solinas M. and Serraiocco A. (1994). Influence of cultivars on the composition and quality of olive oil. *Acta Horticulturae* **356**: 358-361.
- Forina M., Armanino C., Lanteri S., Calcagno C. e Tiscornia E. (1983). Valutazione delle caratteristiche chimiche dell'olio di oliva in funzione dell'annata di produzione mediante metodi di classificazione multivariati. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **60**: 607-613.
- Frega N., Garzi R., Mancuso S. and Rinaldelli E. (1995). The effect of foliar nutrition on olive fruit-set and on the quality and yield of oil: further testing. *Advances in Horticultural Science* **9**: 148-152.

- Frega N., Mozzon M., Bocci F. e Lercker G. (1998). Composizione della drupa di olivo, alcune fasi del processo di trasformazione e qualità degli oli vergini. *Rivista di Frutticoltura* **7/8**: 51-56.
- Galli C. and Visioli F. (1999). Antioxidant and other activities of phenolics in olives / olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* **34**: S23-S26.
- Gandul-Rojas B. and Minguéz-Mosquera M.I. (1996a). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *J. Sci. Food Agric.* **72**: 291-294.
- Gandul-Rojas B. and Minguéz-Mosquera M.I. (1996b). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various spanish olive varieties. *J. Sci. Food Agric.* **72**: 31-39.
- Gandul-Rojas B., Roca-L. Cepero M. and Minguéz-Mosquera M.I. (1999). Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europea* Cv. Arbequina. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2207-2212.
- Gandul-Rojas B., Roca-L. Cepero M. and Minguéz-Mosquera M.I. (2000). Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *JAOCs* **77**: 853-858.
- Gardiman M., Tonutti P., Pizzale L., Conte L. and Carazzolo A. (1999). The effect of hypoxic and CO₂-enriched atmospheres on olive ripening and oil quality. *Acta Horticulturae* **474**: 525-528.
- Gardner H.W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**: 221-239.
- Gasparoli A. e Fedeli E. (1991). Valutazione della shelf-life degli oli vergini di oliva. Nota III: indici spettrofotometrici e analisi HPLC. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **68**: 565-572.
- Gasparoli A., Fedeli E. e Michelini P. (1990). Indagine preliminare sulla valutazione della conservabilità di oli extra vergini confezionati. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **67**: 81-87.
- Georgalaki M.D., Bachmann A., Sotiroudis T.G., Xenakis A., Porzel A. and Feussner I. (1998). Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Lipid* **100**: 554-560.
- Gigliotti C. e Daghetta A. (1993b). Caratterizzazione della produzione oleicola ottenuta nell'annata 1990 in oliveti sperimentali allestiti sulla riviera gardesana. Nota III: parametri di qualità. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **70**: 145-152.
- Gigliotti C., Daghetta A. e Maspero C. (1992a). Caratterizzazione della produzione oleicola ottenuta nell'annata 1990 in oliveti sperimentali allestiti sulla riviera gardesana. Nota I: caratteristiche morfologiche e compositive delle olive ottenute dalle diverse cultivar. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **69**: 347-351.
- Gigliotti C., Daghetta A. e Maspero C. (1992b). Caratterizzazione della produzione oleicola ottenuta nell'annata 1990 in oliveti sperimentali allestiti sulla riviera gardesana. Nota II: valori dei parametri fondamentali di genuinità degli oli ottenuti. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **69**: 499-507.
- Gigliotti C., Daghetta A. e Sidoli A. (1993a). Indagine conoscitiva sul contenuto trigliceridico di oli extra vergini di oliva di varia provenienza. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **70**: 483-489.
- Grechkin A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* **37**: 317-352.
- Guadarrama A., Rodriguez-Mendez M.L., De Saja J.A., Rios J.L. and Olias J.M. (2000). Array of sensors based on conducting polymers for the quality control of the aroma of the virgin olive oil. *Sensors and Actuators B* **69**: 276-282.
- Guadarrama A., Rodriguez-Mendez M.L., Sanz C., Rios J.L. and De Saja J.A. (2001). Electronic nose based on conducting polymers for the quality control of the olive oil aroma – Discrimination of quality, variety of olive and geographic origin. *Analytica Chimica Acta* **432**: 283-292.
- Guinda A., Lanzòn A. and Albi T. (1996). Differences in hydrocarbons of virgin olive oils obtained from several olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1723-1726.
- Gutiérrez-Rosales F., Arnaud T. and Albi M.A. (1999a). Influence of ecological cultivation on virgin olive oil quality. *JAOCs* **76**: 617-621.
- Gutiérrez-Rosales F., Garrido-Fernández J., Gallardo-Guerrero L., Gandul-Rojas B. and Minguéz-Mosquera M.I. (1992a). Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *JAOCs* **69**: 866-871.
- Gutiérrez-Rosales F., Jimenez B., Ruiz A. and Albi M.A. (1999b). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 121-127.
- Gutiérrez-Rosales F., Perdiguero S., Gutiérrez R. and Olias J.M. (1992b). Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *JAOCs* **69**: 394-395.
- Gutiérrez-Rosales F., Varona I. and Albi M.A. (2000). Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1106-1110.

- Hartzallah H. e Kiritsakis A. (1999). Effetto antiossidante degli estratti fenolici della foglia e del frutto dell'olivo. *Olivae* **77**: 47-49.
- Harwood J. and Aparicio R. (2000). Handbook of olive oil: analysis and properties. *An Aspen Publication*.
- Hatanaka A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34**: 1201-1218.
- Hatanaka A., Kajiwara T. and Sekiya J. (1987). Biosynthetic pathway for C₆ aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**: 341-361.
- Iannotta N., Perri E., Sirianni R. and Tocci C. (1999). Influence of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) and *Camarosporium dalmatica* (Thum) attacks on olive oil quality. *Acta Horticulturae* **474**: 573-576.
- Inglese R., Gullo G. and Pace L.S. (1999). Summer drought effects on fruit growth, ripening and accumulation and composition of 'Carolea' olive oil. *Acta Horticulturae* **474**: 269-273.
- Ismail A.S., Stavroulakis G. and Metzidakis J. (1999b). Effect of irrigation on the quality characteristics of organic olive oil. *Acta Horticulturae* **474**: 687-690.
- Ismail A.S., Stavroulakis G., Gerasopoulos D. and Metzidakis J. (1999a). Effect of ethephon on the quality of cv. 'Koroneiki' olive oil. *Acta Horticulturae* **474**: 683-686.
- Jacotot B. (2001). Il valore nutrizionale dell'olio d'oliva. *Olivae* **86**: 27-29.
- Kataoka H., Lord H. L. and Pawliszyn J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatography A* **880**: 35-62.
- Kiritsakis A., Nanos G.D., Polymenopoulos Z., Thomai T. and Sfakiotakis E.M. (1998). Effect of Fruit Storage Conditions on Olive Oil Quality. *JAOCS* **75**: 721-724.
- Kiritsakis A.K. (1998). Flavor components of olive oil – A review. *JAOCS* **75**: 673-681.
- Kolb B. and Ettre L.S. (1997). Static Headspace - Gas Chromatography, theory and practice. *Wiley-VCH*.
- Koprivnjak O. e Pribetić D. (2000). Cultivar autoctone di olivo in Istria – risultati preliminari delle caratteristiche morfologiche e qualità dell'olio. *Atti del convegno "Prospettive dell'ortofruitticoltura e della viticoltura dell'arco alpino nel terzo millennio", Villa Manin di Possariano, Codroipo (Udine – Italy), 8-10 novembre 2000*: 211-215.
- Koprivnjak O., Procida G. and Zelinotti T. (2000). Changes in the volatile components of virgin olive oil during fruit storage in aqueous media. *Food Chemistry* **70**: 377-384.
- Lanza C.M., Russo C. and Tomaselli F. (1998). Relationship between geographical origin and fatty acid composition of extra-virgin olive oils produced in three areas of eastern Sicily. *Ital. J. Food Sci.* **10**: 359-366.
- Le Floch F., Tena M.T., Rios A. and Valcàrcel M. (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta* **46**: 1123-1130.
- Leardi R. e Paganuzzi V. (1987). Caratterizzazione dell'origine di oli di oliva extra vergini mediante metodi chemiometrici applicati alla frazione sterolica. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **64**: 131-136.
- Lee D.S., Noh B.S., Bae S.Y. and Kim K. (1998). Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **358**: 163-175.
- Leone A.M., Santoro M., Liuzzi V.A., La Notte E. e Gambacorta G. (1988). Studio sulla composizione e sulla struttura dei digliceridi dell'olio di oliva. Possibile contributo alla caratterizzazione del prodotto di pregio. *Rivista delle Sostanze Grasse* **65**: 613-622.
- Luning P.A., Carey A.T., Roozen J.P. and Wichers H.J. (1995). Characterization and occurrence of lipoxygenase in bell peppers at different ripening stages in relation to the formation of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1493-1500.
- Maffei M. (1999). *Biochimica vegetale. Piccin*.
- Magni C. (1993). Alla scoperta della qualità: riflessioni teoriche ed evidenze empiriche. *Rivista di Politica Agraria, Rassegna della Agricoltura Italiana* **11**: 17-24.
- Malfatti A., Ranalli A. e Contento S. (2000). Qualità e genuinità degli oli vergini di oliva di pressione estratti con *Cytolase 0. Olivo & Olio* **7/8**: 32-51.
- Mancha M. (1976). Biosíntesis de los ácidos grasos en las plantas. *Grasas y Aceites* **27**:33-39.
- Mancuso S. and Nicese F.P. (1999). Identifying olive (*Olea europea*) cultivars using artificial neural networks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **124**: 527-531.
- Mannina L., Patumi M., Proietti N., Bassi D. and Segre A.L. (2001) Geographical characterization of italian extra virgin olive oils using high-field ¹H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2687-2696.
- Manzi P., Panfilì G., Esti M. and Pizzoferrato L. (1998). Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 115-120.

- Marini D., Magri A.L. e Balestrieri F. (1989). Previsione dei tempi di ritenzione nell'analisi mediante HPLC della composizione trigliceridica degli oli. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* **1**: 23-28.
- Martin Y.G., Pavon J.L.P., Cordero B.M. and Pinto C.G. (1999). Classification of vegetable oils by linear discriminant analysis of Electronic Nose data. *Analytica Chimica Acta* **384**: 83-94.
- Martos P.A. and Pawliszyn J. (1997). Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. *Anal. Chem.* **69**: 206-215.
- McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M. and Robards K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* **73**: 73-84.
- Metzidakis J., Gerasopoulos D. and Naoufel E. (1999). Olive oil quality characteristics of 'Mastoides' olives remaining on the tree after ethephon spray. *Acta Horticulturae* **474**: 677-681.
- Mincione B. e Poiana M. (1999). La conservazione dell'olio di oliva vergine. *Olivo & Olio* **9**: 38-44.
- Mincione B., Giuffrè A. M., Leuzzi U. e Lombardo N. (1994). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali. Nota I: caratterizzazione della produzione della Calabria. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **71**: 335-339.
- Mincione B., Poiana M., Giuffrè A.M., Modafferi V. e Giuffrè F. (1996). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali. Nota II: caratterizzazione dell'olio di Peranzana. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **73**: 245-257.
- Minguez-Mosquera M.I. and Gallardo-Guerrero L. (1995). Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. *J. Sci. Food Agric.* **69**: 1-6.
- Minguez-Mosquera M.I. and Garrido-Fernández J. (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europea*). *J. Agric. Food Chem.* **37**: 1-7.
- Minguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B. and Gallardo-Guerrero M. L. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 60-63.
- Minguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B., Garrido-Fernández J. and Gallardo-Guerrero L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *JAOCS* **67**:192-196.
- Minguez-Mosquera M.I., Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas B., Sanchez-Gòmer A.H. and Garrido-Fernández J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *JAOCS* **68**: 332-336.
- Monografia: Determinazione della stabilità all'ossidazione di oli e grassi con il metodo Rancimat. *Metrohm Italiana srl*.
- Montedoro G.F. (1996). Indici di qualità dell'olio di oliva. Atti del convegno "L'Olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della coltura e della ricerca", Rende (CS - Italia), 26-28 gennaio 1995. Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura, Cosenza - Italy: 585-593.
- Montedoro G.F. e Servili M. (1992). I parametri di qualità dell'olio di oliva ed i fattori agronomici e tecnologici che li condizionano. *Rivista italiana delle sostanze grasse* **69**: 563-573.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M. and Miniati E. (1992a). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1571-1576.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M. and Miniati E. (1992b). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1577-1580.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Magnarini C., Cossignani L. e Damiani P. (1993a). I potenziali modelli che definiscono la tipicità degli oli extra vergini di oliva ed i fattori che vi concorrono alla luce dell'attuazione della d.o.c. *Industrie Alimentari* **32**: 618-631.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Perretti G., Magnarini C., Cossignani L. and Damiani P. (1995). Characterization of some Italian virgin olive oils in relation to origin area. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **72**: 403-414.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E. and Macchioni A. (1993b). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2228-2234.
- Morales M.T., Alonso M.V., Rios J.J. and Aparicio R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 2925-2931.
- Morales M.T., Angerosa F. and Aparicio R. (1999). Effect of extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites* **50**: 114-121.

Morales M.T., Aparicio R. and Calvente J.J. (1996). Influence of olive ripeness on the concentration of green aroma compounds in virgin olive oil. *Flavour & Fragrance Journal* **11**: 171-178.

Morales M.T., Aparicio R. and Rios J.J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J. Chromatography* **668**: 455-462.

Morales M.T., Berry A.J., McIntyre P.S. and Aparicio R. (1998). Tentative analysis of virgin olive oil aroma by supercritical fluid extraction-high-resolution gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatography* **819**: 267-275.

Morales M.T., Rios J.J. and Aparicio R. (1997). Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation - flavors and off-flavors. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2666-2673.

Motilva M.J., Jaria I., Bellart I. y Romero M.P. (1998). Estudio de la calidad del aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen "Les Garrigues" (Lleida) durante la campaña 1995/96. *Grasa y Aceites* **49**: 425-433.

Motilva M.J., Romero M.P., Alegre S. and Girona J. (1999). Effect of regulated deficit irrigation in olive oil production and quality. *Acta Horticulturae* **474**: 377-380.

Motilva M.J., Tovar M.J., Romero M.P., Alegre S. and Girona J. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 2037-2043.

Ninfali P., Aluigi G., Bacchiocca M. and Magnani M. (2001). Antioxidant capacity of extra virgin olive oils. *JAOCS* **78**: 243-247.

Nissiotis M. E. and Tasioula-Margari M. (2001). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. In *Food flavours and chemistry: advances of the new millennium* 578-582. Proceedings of the 10th International Flavor Conference, Paros, Greece, 4-7 July 2000. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Okogeri O.I. and Tasioula-Margari M. (2001). Quality characteristics and storage stability of virgin olive oil. In *Food flavours and chemistry: advances of the new millennium* 492-496. Proceedings of the 10th International Flavor Conference, Paros, Greece, 4-7 July 2000. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Olias J.M., Gutiérrez F., Dobarganes M.C. and Gutiérrez R. (1980). Componentes volátiles en el aroma del aceite de oliva. IV. Su evolución e influencia en el aroma durante el proceso de maduración de los frutos en las variedades Picual y Hojiblanca. *Grasas y Aceites* **31**: 391-402.

Olias J.M., Pérez A.G., Rios J.J. and Sanz L.C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2368-2373.

Oliveros C.M., Pavon P.J., Pinto G.C., La Espada F.M., Cordero M.B. and Forina M. (2002). Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. *Analytica Chimica Acta* **459**: 219-228.

Pagliarini E., Zanoni B. and Giovanelli G. (2000). Predictive study on tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1345-1351.

Paolo F. (1994). An introduction to the problem of evaluating olive oil quality. *Acta Horticulturae* **356**: 315-322.

Parcerisa J., Casals I., Boatella J., Codony R. and Rafecas M. (2000). Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *J. Chromatography* **88**: 149-158.

Pardo M., Sberveglieri G., Taroni A., Fasulli F. and Valentini G. (2001). Decompositive classification models for electronic noses. *Analitica Chimica Acta* **446**: 223-232.

Parmegiani P. e Scarbolo E. (2000). L'olivo e l'oli della regione Friuli Venezia Giulia: cenni storici, produzione, caratterizzazione, tipicità. *Atti del convegno "Prospettive dell'ortofrutticoltura e della viticoltura dell'arco alpino nel terzo millennio", Villa Manin di Possariano, Codroipo (Udine - Italy), 8-10 novembre 2000*: 601-603.

Patumi M., D'Andria R., Fontanazza G., Morelli G., Giorio P. and Sorrentino G. (1999). Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europea* L.) under different irrigation regimes. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **74**: 729-737.

Pawliszyn J. (1997). Solid Phase Microextraction, theory and practice. *Wiley-VCH*.

Pedò S. (A.A. 1999-2000). Caratterizzazione varietale dell'olivo nel basso Garda bresciano. *Tesi di laurea in Scienze Agrarie - Università degli Studi di Milano*.

Pedò S., Tura D., Failla O. e Bassi D. (2002). Caratterizzazione dell'olivicultura del Garda: aspetti compositivi e qualitativi degli oli. *Atti "Convegno Internazionale di Olivicoltura", Spoleto (PG - Italy)*: 503-508.

- Pedò S., Tura D., Failla O. e Bassi D. (2003). Stadio di maturazione ed indici qualitativi e compositivi di oli monovarietali. *L'Informatore Agrario* **14**: 69-73.
- Perera R.M.M., Marriott P.J. and Galbally I.E. (2002). Headspace solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography of wound induced plant volatile organic compound emissions. *Analyst* **127**: 1601-1607.
- Pèrez J.M. A., Blasco F.F.J. e Vergara G.G. (2001). L'olio di oliva vergine della provincia di Madrid – esame qualitativo. *Olivae* **89**: 51-54.
- Piacenti D. (1999). Valutazione di genuinità, qualità e tipicizzazione mediante analisi e panel test. *Olivo & Olio* **7/8**: 18-21.
- Pirisi F.M., Cabras P., Falqui Cao C., Migliorini M. and Muggelli M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. reappraisal of the extraction, hplc separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1191-1196.
- Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S. and Conte L.S. (1999). Methods to evaluate oxidative stability of food lipids. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **76**: 393-394.
- Poiana M., Giuffrè A.M., Sicari V., Mincione B., Marca F., Penitenti M. e Zanelli S. (1999). Ricerche sugli oli di oliva nazionali. Aspetti merceologici della produzione degli oli della Riviera del Garda Bresciano e del Sebino (Annata 1997-1998). Nota 1. *Olivo & Olio* **7/8**: 35-47.
- Poina M., Giuffrè F., Modafferi V., Giuffrè A.M., Calogero V. e Mincione B. (1996). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali – Nota III: contributo alla caratterizzazione dell'olio estratto dalle olive della cv. Carolea, coltivata in due diversi areali della Calabria. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **73**: 499-508.
- Poina M., Mincione A., Giuffrè A.M., Mincione B. e Taccone P. L. (2001a). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali – Nota XI: contributo alla caratterizzazione dell'olio estratto dalle olive della cv. Leccino coltivata in provincia di Reggio Calabria. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 93-115.
- Poina M., Mincione A., Giuffrè A.M., Mincione B. e Taccone P. L. (2001b). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali – Nota XII: contributo alla caratterizzazione dell'olio estratto dalle olive della cv. Picholine coltivata in provincia di Reggio Calabria. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 215-236.
- Poina M., Mincione A., Giuffrè A.M., Mincione B. e Taccone P. L. (2001c). Ricerche sugli oli di oliva monovarietali – Nota XIII: contributo alla caratterizzazione dell'olio estratto dalle olive della cv. Pendolino coltivata in Calabria. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 403-424.
- Pollastri L., Malfatti A., Ranalli A., Contento S. e Iannucci E. (2000). Nuovo enzima di estrazione per oli di oliva vergini. *L'Informatore Agrario* **47**: 63-67.
- Procida G., Gabrielli Favretto L., Vojnovic D., Solinas M. e Zuzic I. (1994). Gli oli d'oliva della penisola istriana, caratterizzazione chimico-analitica dei quattro cultivar più comuni. *Industrie Alimentari* **33**: 308-312.
- Psomiadou E. and Tsimidou M. (1998). Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 5132-5138.
- Psomiadou E. and Tsimidou M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 640-647.
- Rahmani M and Saari Csallany A. (1991). Chlorophyll and β -Carotene Pigments in Moroccan Virgin Olive Oils Measured by High-Performance Liquid Chromatography. *JAOCS* **68**: 672-674.
- Rahmani M., Lamrini M. and Saari Csallany A. (1997). Development of a simple method for the determination of the optimum harvesting date for olives. *Olivae* **69**: 48-51.
- Ranalli A. and Angerosa F. (1996). Integral centrifuges for olive oil extraction – the qualitative characteristics of products. *JAOCS* **73**: 417-422.
- Ranalli A., Cabras P., Iannucci E. and Contento S. (2001a). Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgin olive oil are affected by processing technology. *Food Chemistry* **73**: 445-451.
- Ranalli A., Contento S., Schiavone C. and Simone N. (2001b). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science & Technology* **103**: 228-238.
- Ranalli A., Costantini N., De Mattia G. and Ferrante M.L. (2000). Evaluating two kinds of centrifuged virgin oils arising from continuous olive processing. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 673-683.
- Ranalli A., De Mattia G., Ferrante M.L. and Giansante L. (1997). Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **74**: 501-508.
- Ranalli A., De Mattia G., Patumi M. and Proietti P. (1999). Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas y Aceites* **50**: 249-259.

Ranalli A., Malfatti A. and Cabras P. (2001b). Composition and quality of pressed virgin olive oils extracted with a new enzyme processing aid. *Journal of Food Science* **66**: 592-603.

Ranalli A., Tombesi A., Ferrante M.L. and De Mattia G. (1998). Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 359-367.

REGOLAMENTO CE N. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.

REGOLAMENTO CE N. 356/92 del Consiglio del 10 febbraio 1992 che modifica il regolamento n. 136/66/CE relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi.

REGOLAMENTO CE N. 1683/92 della Commissione del 29 giugno 1992 che modifica il regolamento CE n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.

REGOLAMENTO CE N. 2078/92 del Consiglio del 30 giugno 1992 relativo a metodi di produzione agricola compatibili con le esigenze di protezione dell'ambiente e con la cura dello spazio naturale.

REGOLAMENTO CE N. 2081/92 del Consiglio del 14 luglio 1992 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed alimentari.

REGOLAMENTO CE N. 2082/92 del Consiglio del 14 luglio 1992 relativo alle attestazioni di specificità dei prodotti agricoli ed alimentari.

REGOLAMENTO CE N. 183/93 della Commissione del 29 gennaio 1993 recante modifica del regolamento CE n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché ai metodi ad essi attinenti.

REGOLAMENTO CE N. 656/95 della Commissione del 28 marzo 1995 che modifica il regolamento CE n. 2568/91, relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti e il regolamento CE n. 2658/87 del Consiglio relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune.

REGOLAMENTO CE N. 2472/97 della Commissione dell'11 dicembre 1997 che modifica il regolamento CE n. 2568/91, relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti e il regolamento CE n. 2658/87 del Consiglio relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune.

REGOLAMENTO CE N. 1513/01 del Consiglio del 23 luglio 2001 che modifica il regolamento n. 136/66/CEE e il regolamento n. 1638/98, in ordine alla proroga del regime di aiuto e alla strategia della qualità dell'olio di oliva.

REGOLAMENTO CE N. 1989/03 della Commissione del 6 novembre 2003 che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti.

Reiners J. and Grosch W. (1998). Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2754-2763.

Řezanka T. and Řezanková H. (1999). Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Analytica Chimica Acta* **398**: 253-261.

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P. and Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**: 401-436.

Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Galardi C., Vincieri F.F., Liberatore L. and Cichelli A. (2001). HPLC and HRGC analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia* **53**: 279-284.

Rovellini P., Cortesi N. e Fedeli E. (1997). Ossidazione dei lipidi. Nota 1. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **74**: 181-189.

Ryan D. and Robards K. (1998a). Phenolic Compounds in olives. *Analyst* **123**: 31R-44R.

Ryan D., Robards K. and Lavee S. (1999a). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology* **34**: 265-274.

Ryan D., Robards K. and Lavee S. (1999b). Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatography A* **832**: 87-96.

Ryan D., Robards K. e Lavee S. (1998b). Valutazione della qualità nell'olio d'oliva. *Olivae* **72**: 23-41.

Ryan D., Robards K., Prenzler P. and Antolovich M. (1999c). Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in Analytical Chemistry* **18**: 362-372.

Ryan D., Robards K., Prenzler P., Jardine D., Herit T. and Antolovich M. (1999d). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europea*. *J. Chromatography A* **855**: 529-537.

- Sacchi P., Addeo F., Giudicianni I. and Paolillo L. (1990). Applicazione della spettroscopia ^{13}C -NMR alla determinazione di mono-digliceridi ed acidi grassi liberi nell'olio di oliva di pressione e nei rettificati. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **67**: 245-252.
- Sacchi R., Patumi M., Fontanazza G., Barone P., Fiordiponti P., Mannina L., Rossi E. and Segre A.L. (1996). A high-field ^1H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *JAOCS* **73**: 747-758.
- Saitta M., Lo Curto S., Mavrogeni E., Salvo F. e Dugo G. (2000). Caratterizzazione di oli di oliva vergini siciliani. Nota IV: approccio chemiometrico alla valutazione della resistenza all'autoossidazione. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **77**: 585-595.
- Salas J.J. (1998). Ruta de la lipoxigenasa en aceituna: contribucion a la biogenesis del aroma del aceite de oliva. *Instituto de la Grasa de Sevilla – CSIC – España*.
- Salas J.J. and Sánchez J. (1999). The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 809-812.
- Salch Y.P., Grove M.J., Takamura H. and Gardner H.W. (1995). Characterization of a C-5,13-cleaving enzyme of 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid by soybean seed. *Plant Physiol.* **108**: 1211-1218.
- Salter G.J., Lazzari M., Giansante L., Goodacre R., Jones A., Surricchio G., Kell D.B. and Bianchi G. (1997). Determination of geographical origin of Italian extra virgin olive oil using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. *Journal of Analytical & Applied Pyrolysis* **40**: 159-170.
- Salvator M.D., Aranda F. and Fregapane G. (2001a). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: a study of four successive crop seasons. *Food Chemistry* **73**: 45-53.
- Salvator M.D., Aranda F., Gomez-Alonso S. and Fregapane G. (2001b). Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry* **74**: 267-274.
- Sanchez J. (1994). Lipid photosynthesis in olive fruit. *Prog.Lipid Res.* **33**:97-104.
- Sanelli B. (1981a). La conservabilità degli oli vegetali in rapporto al grado di insaturazione e del contenuto in clorofilla. Nota I: irrancidimento. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 125-130.
- Sanelli B. (1981b). La conservabilità degli oli vegetali in rapporto al grado di insaturazione e del contenuto in clorofilla. Nota II: variazioni dell'acidità, del numero di iodio e della composizione degli acidi grassi. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 184-189.
- Sanelli B. (1981c). La conservabilità degli oli vegetali in rapporto al grado di insaturazione e del contenuto in clorofilla. Nota III: variazioni degli indici spettrofotometrici nell'UV. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 334-340.
- Sanelli B. (1981d). La conservabilità degli oli vegetali in rapporto al grado di insaturazione e del contenuto in clorofilla. Nota IV: variazione del colore e del contenuto in clorofilla. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **58**: 453-458.
- Santinelli F., Damiani P. and Christie W.W. (1992). The triacylglycerol structure of olive oil determined by silver ion high-performance liquid chromatography in combination with stereospecific analysis. *JAOCS* **69**: 552-556.
- Sanz L.C., Pèrez A.G., Rios J.J. and Olias J.M. (1993). Positional specificità of ketodienes from linoleic acid aerobically formed by lipoxygenase isozymes from kidney bean and pea. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 696-699.
- Schiratti G. (1999). Presentation of the study on the influence of environmental, agronomic and processing variables on the characteristics and levels of minor components in extra virgin olive oils. *Olivae* **79**: 38-40.
- Segre A.L. and Mannina L. (1997). ^1H -NMR study of edible oils. *Recent Res. Devel. in Oil Chem.* **1**: 297-308.
- Serani A. e Piacenti D. (2001). Sistema analitico per l'identificazione di oli deodorati in oli vergini di oliva. Nota I – Analisi dei pigmenti clorofilliani in oli vergini di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 459-463.
- Servili M., Baldioli M., Begliomini A.L., Selvaggini R. and Montedoro G. (2000). The phenolic and volatile compounds of virgin olive oil: relationships with the endogenous oxidoreductases during the mechanical oil extraction process. In *Flavour and Fragrance Chemistry*. Edited by Lanzotti V. and Tagliatela-Scafati O. Kluwer, London.
- Solinas M., Angerosa F. e Cucurachi A. (1985). Connessione tra prodotti di neoformazione ossidativa delle sostanze grasse e insorgenza del difetto di rancidità all'esame organolettico – Nota I. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* **14**: 361-368.

Solinas M., Marsilio V. e Angerosa F. (1987). Evoluzione di alcuni componenti dell'aroma degli oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione delle olive. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **64**: 475-480.

Soriano Martin M.L. (1996). The olive fly: protecting the quality of olive oil. *Agricoltura Revista Agropecuaria* **65**: 924-927.

Spugnoli P., Parenti A., Cardini D., Modi G. e Caselli S. (1998). Caratterizzazione di oli extra vergini monovarietali di tre cultivar toscane. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **75**: 227-233.

Staples E.J. (2000). The z-Nose™, A New Electronic Nose Using Acousting Technology. *Acoustical Society of America* **December**: paper number 2aEA4.

Stenson D.F., Lee J.H. and Min D.B. (2002). Solid phase microextraction of volatile soybean oil and corn oil compounds. *J. Food Sci.* **67**: 71-76.

Stefanoudaki E., Chartzoulakis K., Koutsaftakis A. and Kotsifaki F. (2001). Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of cv. Koroneiki. *Grasas y Aceites* **52**: 202-206.

Stefanoudaki E., Kotsifaki F. and Koutsaftakis A. (1997). The potential of HPLC triglyceride profiles for the classification of Cretan olive oils. *Food Chemistry* **60**: 425-432.

Stefanoudaki E., Kotsifaki F. and Koutsaftakis A. (1999). Classification of virgin olive oils of the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition. *JAOCS* **76**: 623-626.

Stefanoudaki E., Kotsifaki F. and Koutsaftakis A. (2000). Sensory and chemical profiles of three European olive varieties (*Olea europea* L.); an approach for the characterisation and authentication of the extracted oils. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 381-389.

Stella R., Barisci J.N., Serra G., Wallace G.G. and De Rossi D. (2000). Characterisation of olive oil by an electronic nose based on conducting polymer sensors. *Sensor and Actuators B* **63**: 1-9.

Storelli M. e Gambacorta G. (1998). Analisi di identità di oli di oliva: approccio metodologico e statistico. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **75**: 383-389.

Tasioula-Margari M. and Okogeri O. (2001). Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC-UV and GC-MS. *J. Food Sci.* **66**: 530-534.

Tateo F., Cucurachi S. e Ferrillo A. (1994). Identificazione per GC/MS di 2,4-dimetilfurano negli oli extra vergini di oliva. *Industrie Alimentari* **33**: 15-19.

Tateo F., Lubian E. e Martello S. (1997). Lezioni di chimica analitica strumentale - vol.I. *Pubblicazione I.S.U.*

Testolin R., Cipriani G., Marrazzo T., Marconi R. e Cimato A. (2000). Identificazione genetica delle varietà di olivo del Garda. *L'Informatore Agrario* **35**: 71-76-.

Tombesi A. e Antaras T. (1998). Le tecniche colturali e la qualità dell'olio d'oliva. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **60**: 25-30.

Tonutti P. (2001). Nelle aree olivicole settentrionali: maturazione e conservazione delle olive e qualità dell'olio. *L'Informatore Agrario* **57**: 62-64.

Tous J., Romero A., Plana J., Guerrero L., Diaz I. and Hermoso J.F. (1997). Chemical and sensory characteristics of Arbequina olive oil obtained in different growing areas of Spain. *Grasas y Aceites* **48**: 415-424.

Tovar M.J., Motilva M.J., Luna M., Girona J. and Romero M.P. (2001). Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies. *JAOCS* **78**: 843-849.

Tura D., Failla O., Bassi D. and Serraiocco A. (2002). Sensory and chemical analyses of monovarietal olive oils from lake Garda (northern Italy). *Acta Horticulturae* **586**: 595-598.

Uceda M. (1983). Factores que influyen en la calidad del aceite de oliva. *Simposio Expoliva 83, Jaen (España)*.

Uceda M., Hermoso M. and Gonzalez J. (1994). Comparison of the olive oil qualities obtained with the two- and three-way decanters. *Acta Horticulturae* **356**: 344-346.

Uceda M., Hermoso M., Garcia-Ortiz A., Jimenez A. and Beltran G. (1999). Intraspecific variation of oil contents and characteristics of oils in olive cultivars. *Acta Horticulturae* **474**: 659-662.

Ussia F. (1999). Attività fisica, radicali liberi e azione antiossidante. *Olivo & Olio* **4**: 80-82.

Vacca V., Fenu P., Franco M.A. e Sferlazzo G. (1993). Primo approccio alla caratterizzazione dei composti fenolici di oli vergini di oliva della Sardegna: elaborazioni statistiche multivariate dei risultati in HPLC. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **70**: 595-599.

Vick B.A. and Zimmerman D.C. (1987a). The lipoxygenase pathway. In *The metabolism, structure, and function of plant lipids* 383-390. Edited by Stumpf P.K., Mudd J.B. and Nes W.D. Plenum Press, New York and London.

- Vick B.A. and Zimmerman D.C. (1987b). Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In *The Biochemistry of Plants* **9**: 53-90. Edited by Stumpf P. K., Academic Press, New York.
- Vlahov G. and Angelo C.S. (1996). The structure of triglycerides of monovarietal olive oils – A ^{13}C NMR comparative study. *Fat Science Technology* **98**: 203-205.
- Vlahov G., Schiavone C. and Simone N. (1999). Triacylglycerols of the olive fruit (*Olea europea* L.): characterization of mesocarp and seed triacylglycerols in different cultivars by liquid chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy. *Lipid* **101**: 146-150.
- Ward K., Scarth R., Daun J.K. and Thorsteinson C.T. (1994). A Comparison of High-Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry to Measure Chlorophyll in Canola Seed and Oil. *JAOCS* **71**: 931-934.
- Wesley I.J., Barnes R.J. and Mc Gill A.E.J. (1995). Measurement of adulteration of olive oils by near-infrared spectroscopy. *JAOCS* **72**: 289-292.
- Wonnacott T.H. e Wonnacott R.J. (1998). Introduzione alla statistica. *FrancoAngeli, Milano*.
- Yacine Z.A., Hiladi S. and Serhrouchni M. (2001). Olive harvest date in the Tadla area: a study of some decisive parameters. *Olivae* **88**:39-45.
- Yang X. and Peppard T. (1994). Solid-phase microextraction for flavour analysis. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 1925-1930.
- Zalejska-Fiolka J. (2000). Antioxidative properties of alfa-tocopherol, methionine and selenomethionine in olive oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **77**: 543-547.
- Zeni S. (A.A. 1999-2000). Accertamenti sulla biologia fiorale dell'olivo nel Garda bresciano. *Tesi di laurea in Scienze Agrarie – Università degli Studi di Milano*.
- Zimbalatti G. (1996). Raccolta delle olive: moderne tecniche di raccolta per produrre olio di qualità. *Macchine & Motori Agricoli* **54**: 21-26.
- Zonta F. e Stancher B. (1987). Contenuto di carotenoidi e qualità merceologica degli oli di oliva. *Rivista delle Sostanze Grasse* **64**: 53-55.
- Zunin P., Boggia R., Rossi N., Evangelisti F. e Tiscornia E. (2001). Progetto Regionale Liguria per il "Miglioramento qualitativo dell'olio di oliva ligure". Risultati di due anni di sperimentazione (1997-98 e 1998-99). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **78**: 17-23.

7 – RIASSUNTO

La qualità dell'olio vergine di oliva è notoriamente influenzata sia da fattori agronomici (genotipo, ambiente e tecniche agronomiche) che da quelli tecnologici (lavorazione e conservazione).

Lo scopo di questa ricerca di dottorato è stato di studiare l'influenza di alcuni fattori genetici ed ambientali sulle caratteristiche degli oli vergini di oliva.

Il primo obiettivo (genotipo) è stato sviluppato considerando tre aspetti: la caratterizzazione degli oli monovarietali in base alle variabili analitiche (caratterizzazione chemiometrica); la caratterizzazione delle drupe in base all'attività degli enzimi della "lipossigenasi" (caratterizzazione enzimatica); ed infine la caratterizzazione degli oli commerciali in base al profilo aromatico dei composti volatili dello spazio di testa (caratterizzazione aromatica).

Il secondo obiettivo (ambiente) è stato analizzato osservando le variazioni qualitative degli oli monovarietali in diversi siti olivicoli nell'area gardesana (influenze nell'area gardesana) ed in tre regioni italiane ben distinte dal punto di vista climatico (influenze regionali in Italia).

Genotipo e qualità: caratterizzazione chemiometrica

Nei quattro anni d'indagine (1998-2001) sono stati analizzati 61 campioni di olio monovarietali ottenuti da 18 cultivar di olivo coltivate in una collezione varietale situata sulla sponda bresciana del lago di Garda.

Gli oli sono stati ottenuti con un micro-oleificio e sono stati classificati tutti come "extra vergini" in base ai valori dell'acidità, del numero di perossidi e degli indici spettrofotometrici nell'U.V. Le determinazioni analitiche effettuate sugli oli hanno interessato la composizione in: acidi grassi, trigliceridi, alcoli alifatici e triterpenici, steroli, polifenoli, tocoferoli, pigmenti (carotenoidi e clorofilla) e composti volatili. Sono state effettuate, inoltre, la determinazione della stabilità ossidativa e l'analisi sensoriale.

Diverse variabili chemiometriche (mediante l'elaborazione statistica dell'analisi della varianza e di raggruppamento) sono risultate utili ad individuare tre gruppi di similarità varietale, in cui le variabili chimiche restano costanti negli anni (nel primo: Casaliva 1, Casaliva 2, Frantoio e Razza; nel secondo: Less e Rossanello; nel terzo: Gargnà e Leccino), ed a separare alcune cultivar che mostrano un alto livello di diversità e specificità (Baia, Grignano, Mitria e Regina).

La stabilità ossidativa è risultata correlata al contenuto in polifenoli ed al rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi. Nelle cultivar Leccino, Miniol, Regina e Rossanello tale stabilità è risultata alquanto elevata.

Le note sensoriali, infine, hanno distinto alcune cultivar e sono risultate correlate ad alcuni composti volatili ed al contenuto in polifenoli.

Genotipo e qualità: caratterizzazione enzimatica

Gli enzimi lipossigenasi ed idroperossido liasi sono stati estratti da 22 campioni di olive di tre cultivar (Casaliva, Frantoio e Leccino) raccolte a diverse maturazioni in due anni (2000 e 2001) e la loro attività è stata misurata spettrofotometricamente a 234nm.

L'attività enzimatica è aumentata nella fase finale dell'invaiaitura, indicando il periodo ottimale per la raccolta al fine di ottenere oli più ricchi di composti aromatici (responsabili delle "note verdi"). Le cultivar, inoltre, si sono differenziate in base al contenuto enzimatico, confermando i risultati del profilo aromatico degli stessi oli.

Genotipo e qualità: caratterizzazione aromatica

Il profilo dei composti volatili degli 40 campioni di oli vergini di oliva commerciali è stato determinato mediante estrazione con SPME ed analisi con GC-FID/MS.

L'analisi accoppiata SPME-GC è risultata una tecnica utile per determinare i composti aromatici.

L'analisi statistica di raggruppamento sui composti volatili ha messo in evidenza che la cultivar è il fattore più importante nella determinazione dei gruppi, mentre il tempo e la temperatura di gramolatura esercitano un effetto secondario sul profilo aromatico. Gli oli commerciali australiani, inoltre, si sono distinti da quelli europei per il quantitativo del *trans*-2-esenale.

Ambiente e qualità: influenze nell'area gardesana

Nei quattro anni di osservazione (1998-2001) sono stati analizzati 77 campioni di olio monovarietali ottenuti da 4 cultivar (Casaliva, Frantoio, Leccino e Pendolino) coltivate in 17 aziende nell'area gardesana (BS).

Gli oli sono stati lavorati ed analizzati come descritto precedentemente.

Le variabili chemiometriche sono risultate quasi sempre significativamente diverse tra le cultivar, poco tra gli anni, solo raramente tra le aziende e quasi mai nelle interazioni tra cultivar, aziende ed anni.

Casaliva e Frantoio non si sono quasi mai differenziate tra di loro, mentre Leccino e Pendolino sono risultati sempre distinti in base ad alcune variabili chemiometriche caratterizzanti. I quattro anni di indagine sono risultati quasi sempre indistinti, solo il 1998 si è a volte separato dagli altri in base ad alcune variabili. Le aziende olivicole, invece, non sono mai risultate separate significativamente tra di loro.

La stabilità ossidativa è risultata correlata al contenuto in polifenoli totali ed al rapporto acidi grassi saturi su polinsaturi. Le note sensoriali non hanno separato le cultivar, ma hanno distinto il 2000 dagli altri anni.

Ambiente e qualità: influenze regionali in Italia

Nei due anni di osservazione (2000 e 2001) sono stati analizzati 33 campioni di olio monovarietali ottenuti da 3 cultivar (Casaliva, Frantoio e Leccino) in tre stadi di maturazione (verde, invaiato e maturo), coltivate in tre regioni italiane (Lombardia, Toscana ed Abruzzo).

Gli oli sono stati lavorati ed analizzati come descritto in precedenza.

Le variabili chemiometriche dei campioni di olio sono risultate quasi sempre utili a separare le cultivar nelle regioni sia in base agli stadi di maturazione, sia nel loro insieme, anche se Casaliva e Frantoio spesso risultano indistinte, ma separate da Leccino. Alcune variabili sono risultate particolarmente caratterizzanti nel definire sia le cultivar sia le regioni.

La stabilità ossidativa è risultata correlata al contenuto totale in polifenoli e tocoferoli, mettendo in evidenza la cultivar Leccino e la regione Toscana.

L'analisi sensoriale ha separato le cultivar abruzzesi e toscane, ma non quelle lombarde.

L'influenza del genotipo (cultivar) risulta il fattore più importante nel definire la qualità dell'olio vergine di oliva. L'influenza ambientale (pedo-climatica), invece, interviene solo secondariamente ed è significativa su scala macro-climatica (regionale), ma non in quella meso-climatica (localizzazione aziendale degli oliveti).

Le variabili chemiometriche ottenute dall'analisi chimico-fisiche degli oli sono risultate statisticamente efficaci e valide nella caratterizzazione delle cultivar e nell'identificazione ambientale.